N° d'ordre : 129

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE [illegible]

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

MICHEL AVIGNON

Ingénieur-Chimiste E. N. S. C. L.

Licencié ès-Sciences Physiques

1re Thèse : Étude conformationnelle de quelques peptides [illegible] par Spectroscopie infrarouge.

2e Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le **22 mars 1969**, devant la Commission d'Examen :

M. PACAULT, Membre correspondant de l'Institut
Professeur ..... Président

Mlle JOSIEN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
M. BOTHOREL, Professeur ..... Examinateurs
M. LASCOMBE, Professeur .....

1969

N° d'ordre : 129

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

MICHEL AVIGNON

Ingénieur-Chimiste E. N. S. C. B.
Licencié ès-Sciences Physiques

1re Thèse : Étude conformationnelle de quelques peptides à chaine courte par Spectroscopie infrarouge.

2e Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le **22 mars 1969**, devant la Commission d'Examen :

M. PACAULT, Membre correspondant de l'Institut
Professeur ..... Président

Mlle JOSIEN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
M. BOTHOREL, Professeur ..... Examinateurs
M. LASCOMBE, Professeur .....

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE
DE BORDEAUX

FACULTE DES SCIENCES

Doyen honoraire : M. BRUS

Doyen : M. CALAS

Professeurs honoraires :

M. KASTLER..... Professeur à la Sorbonne
M. PISOT..... Professeur à la Sorbonne
Mlle JOSIEN..... Professeur à la Sorbonne
M. MILLOUX
M. DANGEARD
M. CAU
M. GENEVOIS

Professeurs -

M. BRUS..... Chimie
M. AVEL..... Zoologie et physiologie animale
M. ROUSSET..... Physique générale
M. ROGER..... Mécanique rationnelle
M. WEILL..... Anatomie comparée et embryogénie
M. DUFRESNOY..... Mathématiques générales
M. LAFON ..... Physiologie générale
M. BOUNHIOL..... Biologie animale
M. SERVANT..... Physique
M. CALAS..... Chimie organique
M. GAY..... Cristallographie et minéralogie
M. PACAULT..... Chimie physique
M. SCHOELLER..... Géologie
M. DAVID ..... Physiologie végétale
M. COLMEZ..... Méthodes mathématiques de la physique
M. CAMBAR..... Biologie animale
M. VIGNEAUX..... Géologie
M. PANOUSE..... Zoologie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
M. ARZELIES..... Physique (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
M. RIBEREAU-GAYON..... Oenologie et chimie agricole
M. RISS..... Mathématiques
M. GUIZONNIER..... Physique
M. HAGET..... Zoologie expérimentale

M. SEMIROT ..... Astronomie
M. CHASTEL ..... Physique nucléaire
M. HAGENMULLER ..... Chimie minérale
M. CREAC'H ..... Biologie animale
M. LOUDETTE ..... Mécanique physique
M. PATY ..... Chimie
M. BORDES ..... Préhistoire
M. SECHET ..... Botanique
M. BAGANAS ..... Mathématiques
M. VALENTIN ..... Radioélectricité
M. ENNOUCHI ..... Géologie
M. EYME ..... Botanique
M. RUAMPS ..... Physique électronique
M. FRAINNET ..... Chimie organique
M. HOARAU ..... Chimie physique
M. MARCHAND ..... Chimie
M. L'LANDE ..... Chimie appliquée
M. GOTTIS ..... Géologie dynamique
M. LEMANCEAU ..... Chimie
M. CARDO ..... Psychophysiologie
M. ROCH ..... Physique
M. BELLON ..... Chimie (détaché à la faculté des Sciences du Maroc)
M. CLASTRE ..... Cristallographie physique
M. JOUSSOT-DUBIEN ..... Chimie
M. VALADE ..... Chimie organique
M. SURDIN ..... Automatique
M. LABOUESSE ..... Biochimie
M. BLONDEL ..... Mathématiques
M. SOURISSEAU ..... Chimie
Mlle FAURE-MURET ..... Géologie (détachée à la Faculté des Sciences du Maroc)
M. CLIN ..... Géologie
M. LOCHET ..... Physique
M. VINDT ..... Biologie végétale
M. REGNIER ..... Mathématiques
Mlle LAFFITTE ..... Physique
M. DESTRIAU ..... Chimie
M. PETIT ..... Physique corpusculaire
M. BARAUD ..... Chimie biologique
M. EMBERGER ..... Géologie
M. BOTHOREL ..... Chimie
M. CHARRU ..... Physique
M. SIMONOFF ..... Chimie Physique
M. LASCOMBE ..... Chimie
M. RIMPAULT ..... Physique théorique
M. BARETS ..... Biologie animale
M. PINEAU ..... Chimie
M. LEVEQUE ..... Géologie approfondie
M. BOUSSEAU ..... Physique
M. MENNRATH ..... Physique
M. ANDRE ..... Biologie générale
M. BOUAS-LAURENT ..... Chimie organique
M. MARTINET ..... Calcul infinitésimal
M. N. ..... Informatique

Maître de conférences honoraire -

M. DE PUYMALY

Maîtres de conférences -

M. RIBEREAU-GAYON Pascal.....	Chimie oenologie
Mlle DUTRIEU.....	Physiologie animale
M. RAULT.....	Chimie minérale
Mme PETIT.....	Physique
M. BERNET.....	Génétique
M. FRESNEL.....	Mathématiques
M. MOYES.....	Géologie
M. LUTZ.....	Botanique
M. MOULINES.....	Chimie
M. MENDES-FRANCE.....	Mathématiques
M. POUCHARD.....	Chimie minérale
M. SARDOS.....	Physique
M. DUMERY.....	Mécanique
M. GARNIER.....	Biophysique
M. LESCA.....	Mathématiques
M. ARTOLA.....	Mathématiques
M. DRESS.....	Mathématiques
M. BOUARD.....	Biologie végétale
M. DE MAHTAN.....	Mathématiques
M. ABGRALL.....	Physique théorique
M. MINNAERT.....	Physique théorique

Conseiller Administratif -

M. LLORENS

Je désire avant tout exprimer ma très profonde reconnaissance à Monsieur LASCOMBE, Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire, m'a proposé le sujet de cette thèse et m'a fait sans cesse bénéficier de ses encouragements et de ses conseils.

Je sais gré à Monsieur le Professeur PACAULT, membre correspondant de l'Académie des Sciences, de m'avoir offert la possibilité de travailler dans les laboratoires du centre de Recherche Paul Pascal qu'il dirige, et d'avoir bien voulu accepter de présider mon jury de thèse.

J'ai plus spécialement effectué ce travail sous la direction collégiale de Mademoiselle GARRIGOU-LAGRANGE et de Monsieur PHAM VAN HUONG, Maîtres de Recherche au C.N.R.S. Qu'ils veuillent bien trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude pour l'aide constante et amicale qu'ils m'ont apportée en toutes circonstances.

Mademoiselle JOSIEN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, a accepté de venir juger mon travail. Je tiens à lui exprimer ici ma très respectueuse gratitude.

Je remercie Monsieur BOTHOREL, Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux, d'avoir bien voulu faire partie de mon jury de thèse.

Monsieur NEEL, Professeur à la Faculté des Sciences de Nancy, ainsi que Monsieur MARRAUD, Attaché de recherche au C.N.R.S., ont mis à ma disposition les produits qui ont fait l'objet de ce travail et m'ont fait profiter, lors de fructueuses discussions, de leur grande expérience dans le domaine des macromolécules. Je les en remercie très chaleureusement.

Je remercie vivement Monsieur GAY, Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux, et Monsieur NGUYEN-BA-CHANH, Chargé de Recherche au C.N.R.S., de m'avoir aidé à tirer le meilleur parti de nos premiers résultats radiocristallographiques.

Au cours de l'élaboration de cette thèse, j'ai pu profiter des compétences et de l'esprit d'entraide de chacun des Membres du Laboratoire de Spectroscopie Infrarouge et du Centre de Recherche Paul Pascal. Je tiens à les en remercier tous très sincèrement et d'une façon toute particulière Monsieur

Grenié dont j'apprécie depuis longtemps la chaleureuse amitié.

Ce travail a bénéficié de l'aide matérielle du Commissariat à l'Energie Atomique.

PREMIERE THESE

ETUDE CONFORMATIONNELLE DE QUELQUES PEPTIDES A CHAINE COURTE PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

SOMMAIRE

- INTRODUCTION GENERALE -

- PREMIERE PARTIE : ETUDE SPECTROSCOPIQUE DES CONFORMATIONS DES DIPEPTIDES EN SOLUTION -

INTRODUCTION

CHAPITRE I: Etude par spectroscopie infrarouge des conformations des dipeptides en solution dans le tétrachlorure de carbone

1,1,1: Identification des massifs correspondant aux vibrateurs NH libres et NH chélatés

1,1,2: Liaisons hydrogène intramoléculaires et conformations des dipeptides.

1,1,3: Influence des radicaux latéraux et terminaux.

1,1,4: Influence de la deutériation sur le spectre des dipeptides en solution.

CHAPITRE II : Influence de l'autoassociation et de la complexation sur le spectre et la conformation des dipeptides

1,2,1: Liaisons hydrogène intermoléculaires ou autoassociation

1,2,2: Influence des solvants donneurs et accepteurs de protons sur le spectre et sur la conformation des dipeptides.

CHAPITRE III : Dosage des conformères des dipeptides en solution

1,3,1: Principe de la méthode

1,3,2: Applications et vérifications de la méthode

1,3,3: Discussion des résultats

CONCLUSION

- DEUXIEME PARTIE: ETUDE SPECTROSCOPIQUE ET STRUCTURALE DES OLIGOPEPTIDES $R\text{-}CO(NH\text{-}CHR_1\text{-}CO)_n\ NH\text{-}R_2$ A L'ETAT CONDENSE -

INTRODUCTION

CHAPITRE I: Attribution du spectre infrarouge des oligoglycines $CH_3\text{-}CO(NH\text{-}CH_2\text{-}CO)_n\ NH\text{-}C_2H_5$ (A Gly_nEA) à l'état solide

II,1,1: Méthode d'attribution

II,1,2: Résultats expérimentaux

II,1,3: Interprétation

CHAPITRE II: Conformation des oligoglycines A Gly_nEA

II,2,1: Observations préliminaires

II,2,2: Corrélations entre le spectre infrarouge et la conformation des oligoglycines

II,2,3: Etude des A Gly_nEA et de PGII par diffraction des rayons X

- CONCLUSION GENERALE -

- PARTIE EXPERIMENTALE -

- BIBLIOGRAPHIE -

- INTRODUCTION -

Il est souvent admis que l'activité sélective d'une protéine en milieu biologique est liée en partie à sa conformation. L'étude de cette dernière a pu être abordée grâce aux polypeptides synthétiques. Au cours des dernières années, de nombreuses informations théoriques et expérimentales ont été accumulées dans ce domaine par l'étude directe de ces macromolécules (1,2).

Des renseignements complémentaires peuvent être fournis par l'examen de petites molécules modèles reproduisant aussi fidèlement que possible les séquences peptidiques. En effet, des calculs, fondés sur l'utilisation de fonctions potentiel semi-empiriques décrivant les interactions entre atomes, ont permis de déterminer a priori les conformations les plus probables pour de tels modèles (3). Signalons toutefois que ces résultats ne sont applicables qu'aux chaînes isolées. Or la stabilisation des structures peptidiques dépend, non seulement des forces intramoléculaires dont il est tenu compte dans ces calculs, mais aussi des forces intermoléculaires. Parmi ces dernières, les liaisons hydrogène jouent un rôle particulièrement important. Jusqu'à présent, à notre connaissance, peu d'études ont eu pour objet de distinguer l'influence de ces forces d'interaction sur les conformations des chaînes courtes.

Il nous a donc paru intéressant de chercher à connaître le rôle des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires dans la conformation des peptides sous différents états physiques et de tester les possibilités d'investigation de la spectroscopie infrarouge dans ce domaine.

Nous avons choisi pour cette analyse des oligopeptides de la forme $R\text{-}CO(NH\text{-}CHR_1\text{-}CO)_n NH\text{-}R_2$ dont les synthèses ont été entièrement mises

au point et réalisées dans le laboratoire de chimie organique industrielle de Nancy (4).

Certains de ces composés sont légèrement solubles dans les solvants organiques usuels, ce qui permet de les étudier à l'état isolé et de confronter les résultats expérimentaux obtenus avec les conclusions théoriques antérieures. Ils se prêtent en outre à une analyse spectroscopique comparative des chaînes polypeptidiques de différentes longueurs, analyse qui peut conduire à la connaissance de l'influence du nombre de motifs sur leurs modes d'enchaînement.

Nous présenterons dans ce mémoire notre contribution à l'étude spectroscopique et conformationnelle de ces molécules.

PREMIERE PARTIE

ETUDE SPECTROSCOPIQUE DES CONFORMATIONS DES DIPEPTIDES EN SOLUTION

INTRODUCTION -

Les chaînes polypeptidiques peuvent présenter des conformations variées qui sont stabilisées par des forces de Van der Waals ou de liaison hydrogène entre atomes ou groupements d'atomes non liés.

Les dipeptides constituent les molécules modèles les plus simples permettant une étude des interactions à courte distance sur l'enchaînement peptidique. En outre, ces molécules peuvent simuler la première étape dans l'édification de la structure macromoléculaire des polypeptides.

Quelques auteurs (5, 6) ont pu calculer a priori les conformations les plus stables pour un enchaînement de deux unités peptidiques $-CONH-CHR_1-CONH-$ en fonction de la nature de la chaîne latérale R_1 à l'aide de critères stériques. Néanmoins, ces résultats ne sont applicables qu'aux molécules isolées car, à l'état condensé, des forces intermoléculaires interviennent en plus des forces intramoléculaires dont il est tenu compte dans le calcul.

Pour distinguer ces deux effets, on peut étudier des molécules modèles dissoutes dans un milieu relativement inerte. Il est en effet possible de rendre les dipeptides légèrement solubles dans un grand nombre de solvants organiques usuels en "bloquant" leurs extrémités ioniques grâce à des radicaux hydrophobes. On obtient de cette manière des composés:

$$R - CONH - CHR_1 - CONH - R_2 \qquad \text{(type I)}$$

Quelques uns de ces dérivés ont déjà fait l'objet d'analyses spectroscopiques dès 1959 par Mizushima, Shimanouchi, Tsuboi et leurs collaborateurs (7, 8, 9, 10, 11, 12). Ces auteurs ont pu suggérer l'existence de certaines conformations par l'étude détaillée des vibrations de valence ν (NH). Cependant, leurs attributions nous ont semblé assez mal assurées: en particulier la bande située vers 3 420 cm^{-1} qu'ils assignent à un groupement "NH libre" nous a paru anormalement basse. Aussi avons-nous jugé intéressant de vérifier cette interprétation et d'étendre leur méthode à d'autres peptides afin de préciser non seulement les diverses conformations les plus probables en solution mais aussi l'influence de la nature des radicaux R_1 et R_2 sur ces dernières.

Nous avons étudié, dans cette intention, le spectre d'un certain nombre de dipeptides de type I (CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2) en solution dans le tétrachlorure de carbone à diverses concentrations et températures.

Dans le but de caractériser individuellement l'aptitude de chacun des groupements NH à former des liaisons hydrogène, nous avons examiné les composés modèles suivants, dérivant des précédents par le "blocage" d'un des groupes NH grâce à un radical aliphatique:

$$R\text{-}CON\,(CH_3)\text{-}CHR_1\text{-}CONH\text{-}R_2 \qquad \text{(type II)}$$

$$R\text{-}CONH\text{-}CHR_1\text{-}CON\begin{matrix}\diagup R_2\\ \diagdown R_3\end{matrix} \qquad \text{(type III)}$$

Des informations complémentaires seront fournies par l'étude de l'effet de la deutériation sur le spectre de certains de ces modèles. Nous analyserons aussi l'influence de l'autoassociation et de la complexation avec des solvants donneurs et accepteurs de protons sur le spectre et la conformation des dipeptides. Nous présenterons enfin une méthode de dosage des divers conformères des dipeptides en solution et son application.

CHAPITRE I

ETUDE PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE DES CONFORMATIONS DES DIPEPTIDES EN SOLUTION DANS LE TETRACHLORURE DE CARBONE

Les spectres infrarouges des dipeptides des types I, II et III présentés ci-après ont été enregistrés en solution dans le tétrachlorure de carbone, dans la région des vibrations de valence ν(NH)- vers 3 400 cm^{-1} et ν (ND)- vers 2 500 cm^{-1} pour certains dipeptides N-deutériés-

Type I: R - CONH - CHR_1 - CONH - R_2

Représentation générale	Notation * abrégée	R_1	R_2	Amino acide de départ
A Gly MA	A Gly MA	- H	$-CH_3$	Glycine
ARMA	A Nor MA	$-(CH_2)_3CH_3$	$-CH_3$	dl Norleucine
	A Met MA	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$	$-CH_3$	l Méthionine
A Gly EA	A Gly EA	- H	$-C_2H_5$	Glycine
AREA	A Ala EA	$-CH_3$	$-C_2H_5$	dl Alanine
	A Nor EA	$-(CH_2)_3CH_3$	$-C_2H_5$	dl Norleucine
	A Val EA	$-CH-(CH_3)_2$	$-C_2H_5$	dl Valine
	A Met EA	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$	$-C_2H_5$	l Méthionine
	A Phe EA	$-CH_2-C_6H_5$	$-C_2H_5$	l Phénylalanine

(*) Exemple: A Gly MA = Acétyl Glycine N Méthyl Amide:

$CH_3-CONH-CH_2-CONH-CH_3$

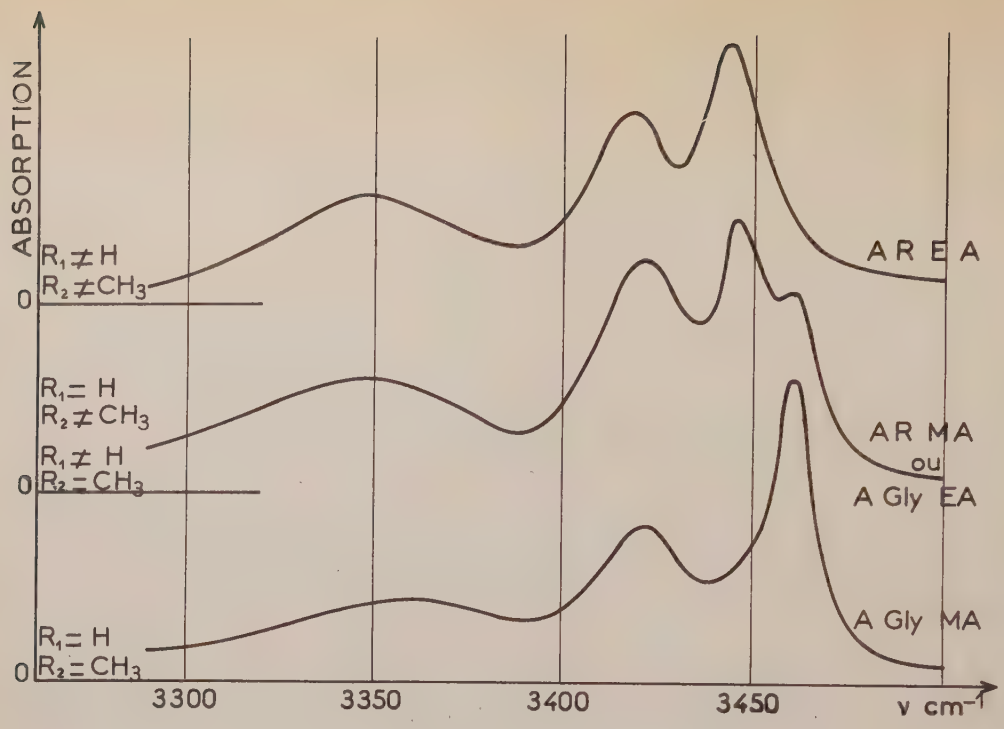


Fig. 1 - Types de profils présentés par les dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone, dans la région ν(N-H).

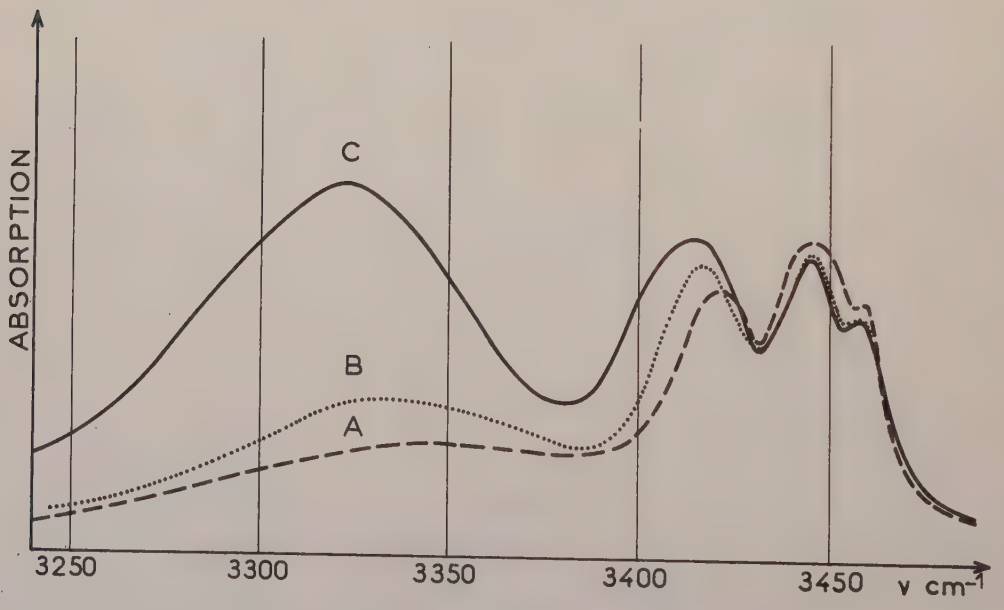


Fig. 2 - Evolution des absorptions ν(N-H) de AGlyEA en solution dans le tétrachlorure de carbone en fonction de la température et de la concentration.

A : -------- c = $1,5 . 10^{-4}$ M/l t = 70°C

B : ..... c = $5. 10^{-5}$ M/l t = 20°C

C : ——— c = 5.10^{-4} M/l t = 20°C

Type II: $R\text{-}CON(CH_3)\text{-}CHR_1\text{-}CONH\text{-}R_2$:

A Sar MA: $CH_3\text{-}CON(CH_3)\text{-}CH_2\text{-}CONH\text{-}CH_3$

A Sar EA : $CH_3\text{-}CON(CH_3)\text{-}CH_2\text{-}CONH\text{-}C_2H_5$

Type III:

A Gly $(EA)_2$: $CH_3\text{-}CONH\text{-}CH_2\text{-}CON(C_2H_5)_2$

Les concentrations des solutions ont été choisies proches de 10^{-5} Mole/litre pour éviter toute autoassociation.

Dans ce chapitre nous étudierons donc uniquement le spectre et la conformation des espèces monomoléculaires.

1,1,1 : Identification des massifs correspondant aux vibrateurs N-H libres et N-H chélatés.

Dans la région des vibrations ν (N-H), le spectre des solutions diluées dans le tétrachlorure de carbone ne contenant que des espèces monomoléculaires, présente, suivant le dipeptide, trois au quatre bandes (fig.1, tableau I).

Tableau I - Fréquences d'absorption ν (NH) en cm^{-1} des dipeptides en solution diluée dans CCl_4 à 25°C ($C \simeq 2.10^{-4}$ Mole/litre).

COMPOSES	NH CHELATES		NH LIBRES	
	C_7	C_5	L_β	L_α
A Gly MA	3356	3421		3461
A Nor MA	3348	3424	3444	3462
A Met MA	3345	3426	3440	3460
A Gly EA	3340	3417	3445	3460
A Ala EA	3332	3416	3445	
A Val EA	3322	3423	3443	
A Met EA	3332	3422	3442	
A Phe EA	3325	3421	3441	
A Sar MA	3365			3455
A Sar EA	3355		3442	
A Gly $(EA)_2$		3415		
BAM*				3460

*BAM : Bis acétamido méthylène = $CH_3\text{-}CONH\text{-}CH_2\text{-}NHCO\text{-}CH_3$

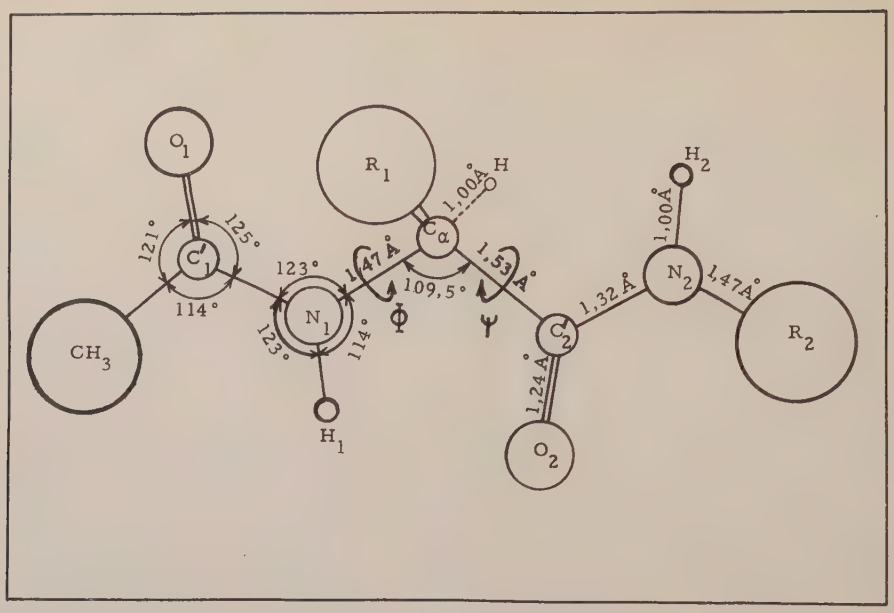


Fig. 3 - Angles et longueurs de liaisons d'un dipeptide d'après Pauling et Corey (14).

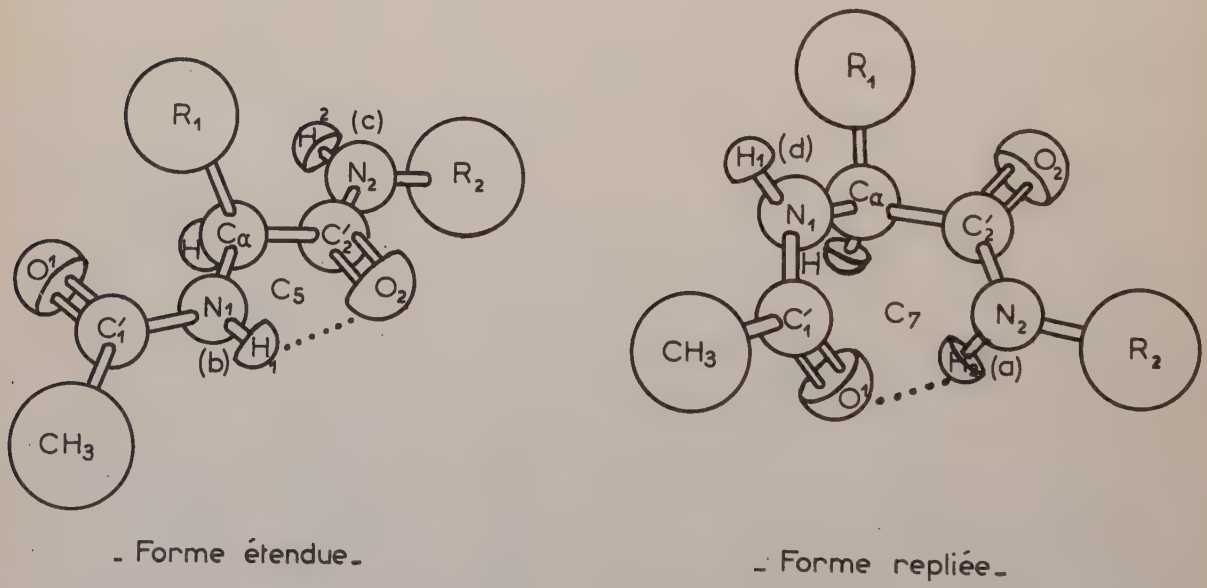


Fig. 4 - Représentation des cycles de chélation C_5 et C_7. R_1 correspond à un α-amino acide L.

La disparition progressive de ces absorptions lorsque croît le taux de deutériation sur les atomes d'azote confirme bien qu'elles proviennent toutes des vibrateurs N-H (cf. ci-après). En outre, la position relativement basse des deux bandes situées vers 3 350 cm^{-1} et 3 420 cm^{-1} suggère qu'elles n'appartiennent pas à des groupements NH libres. En effet, une élévation de température de 10°C à 70°C d'une solution à $1,5 \times 10^{-4}$ Mole/litre nous a montré que l'intensité de ces deux absorptions diminue fortement au profit du massif de haute fréquence. Mais à cette concentration et à 10°C il y a encore une petite proportion de dipeptides autoassociés. L'élévation de la température a donc dissocié les espèces multimoléculaires. En outre, la comparaison entre les spectres des deux solutions de A Gly EA ($1,5 \times 10^{-4}$ Mole/litre à 70°C et 5×10^{-5} Mole/litre à 20°C où ne subsistent comme nous l'avons vu plus haut que des espèces monomoléculaires) montre qu'à température élevée l'intensité des bandes de basse fréquence diminue (fig.2). Ces bandes doivent donc correspondre aux vibrateurs N-H chélatés. Notons que le glissement de leurs fréquences alors que la position du massif de haute fréquence reste pratiquement inchangé est parfaitement compatible avec cette attribution.

Pour un dipeptide de type I, on peut concevoir plusieurs formes chélatées. En effet, si l'on admet que dans ces modèles le groupement amide- CONH- est plan et en position "trans", la rotation de ces groupements autour des liaisons N_1-C_α et C_α - C'_2 (fig. 3) conduit à envisager deux possibilités de liaison hydrogène intramoléculaire: l'une intervient dans la conformation étendue et forme avec les atomes H_1, N_1, C_α, C'_2, O_2 un cycle à 5 chainons (C_5) tandis que l'autre favorise le repliement de la molécule en liant les atomes O_1, C'_1, N_1, C_α, C'_2, N_2, H_2 suivant un cycle à 7 chainons (C_7). Ces deux conformations sont représentées sur la figure 4. Nous allons les examiner plus en détail.

1,1,2 - Liaisons hydrogène intramoléculaires et conformations des dipeptides.

Dans l'hypothèse de la rigidité du groupement amide plan en position "trans", la conformation d'un dipeptide peut être décrite sans ambiguité lorsque l'on connaît la valeur des deux angles azimutaux Φ et ψ qui caractérisent les rotations autour des liaisons N_1 - C_α et C_α - C'_2 (fig. 3). Conformément aux notations préconisées par Edsall et coll. (13), ces angles sont comptés positivement quand la rotation s'effectue dans le sens des aiguilles d'une montre autour des liaisons orientées dans le sens $N_1 \longrightarrow C_\alpha$ et $C_\alpha \longrightarrow C'_2$.

Les angles $\Phi = 0$ et $\psi = 0$ définissent la conformation totalement étendue. Nous adopterons pour nos modèles les angles et les longueurs de liaisons utilisés par Pauling et Corey (14). Ces valeurs sont résumées sur la figure 3.

a) Conformation étendue, C_5

Les expressions du potentiel de torsion V_Φ et V_ψ autour des liaisons $N_1 - C_\alpha$ et $C_\alpha - C'_2$, proposées par Brant, Miller et Flory (15, 16), passent par des minimums lorsque les angles Φ et ψ prennent les valeurs 0° et ± 120°.

Signalons d'autre part que l'interaction par liaison hydrogène $H_1 \ldots O_2$, bien que très faible, est maximale lorsque les deux angles Φ et ψ sont nuls; les paramètres de cette liaison sont alors:

distance	$N_1 \ldots O_2 = 2{,}70$ Å
distance	$H_1 \ldots O_2 = 2{,}15$ Å
angle	$H_1 N_1 O_2 = 50°$

D'un point de vue purement stérique, les calculs de Ramachandran (5) et Scheraga (6) indiquent que la conformation totalement étendue, bien que parfaitement permise lorsque $R_1 = H$ (résidu Glycyl), est très légèrement défavorisée lorsque la chaine latérale contient un carbone β. Compte tenu de toutes ces raisons, nous pouvons nous attendre à ce que les formes C_5 présentent des angles azimutaux Φ et ψ peu différents de zéro quelle que soit la nature du radical R_1.

b) Conformation repliée, C_7

Ramachandran et coll. (5) suggèrent l'existence d'une zone très favorable à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire de type C_7 aux environs des points ($\Phi = 100°$, $\psi = 240°$) et ($\Phi = 260°$, $\psi = 120°$) si $R_1 = H$ (résidu Glycyl). Pour les autres modèles, une seule conformation C_7 est stériquement permise ($\Phi = 100°$, $\psi = 240°$), la liaison $C_\alpha - C_\beta$ se trouve alors en position équatoriale par rapport au cycle de chélation. La liaison hydrogène ainsi formée possède les caractéristiques d'une interaction forte:

distance	$N_2 \ldots O_1 = 2{,}70$ Å
distance	$O_1 \ldots H_2 = 1{,}75$ Å
angle	$O_1 N_2 H_2 = 23°$

Notons que pour cette forme les angles Φ et ψ correspondent pratiquement à des minimums du potentiel de torsion; des zones probables de conformation C_5 et C_7 sont représentées sur la figure 5 dans le cas général où R_1 est différent de H.

Sur les spectres des dipeptides en solution diluée, nous avons noté l'existence de deux bandes conrrespondant à des vibrateurs NH chélatés. D'après leurs fréquences, nous sommes tentés d'attribuer celle vers 3 350 cm^{-1} au vibrateur N-H (a) du cycle C_7 et celle vers 3 420 cm^{-1} au groupement N-H (b) de la forme C_5. Ces premières considérations sont compatibles avec les abaissements de fréquence que l'on peut attendre pour de tels cycles de chélations (17, 18, 19).

Pour confirmer ces attributions nous avons comparé les spectres obtenus avec ceux des composés de type II et III. On sait en effet qu'une molécule de type II dans laquelle l'azote N_1 a été substitué par un groupement méthyle peut se présenter sous la forme étendue et sous la forme repliée C_7. Au contraire, une molécule de type III se trouve exclusivement sous la forme C_5 car dans ce dernier cas, la cyclisation C_7 est interdite par la substitution effectuée sur l'atome d'azote N_2. La figure 6 montre que dans le premier cas (A Sar EA) la bande située vers 3 360 cm^{-1} correspond au vibrateur N-H (a) chélaté suivant un cycle C_7. Dans le second cas (A Gly $(EA)_2$), la bande intense observée à 3 415 cm^{-1} est assignée au groupement NH(b) chélaté suivant un cycle C_5. L'absence dans le premier cas d'une absorption vers 3 420 cm^{-1} et dans le second, d'une bande à 3 350 cm^{-1} permet de confirmer notre interprétation sans aucune ambiguité et nous amène à rejeter les attributions de Mizushima et coll. (12). En effet, ces auteurs font correspondre la bande située vers 3 420 cm^{-1} au groupement N-H (d) libre de la forme cyclisée C_7. Or nous venons de voir que A Gly $(EA)_2$ présente cette absorption bien qu'il soit dans l'impossibilité de se chélater suivant le modèle C_7.

L'existence simultanée des deux conformations "étendue" (C_5) et "repliée" (C_7) en équilibre à la température ordinaire prouve que la différence d'énergie entre ces deux formes est faible. Néanmoins, la forte diminution de l'intensité de l'absorption située vers 3 350 cm^{-1} par rapport à celle de la bande vers 3 420 cm^{-1} observée par élévation de température indique qu'il y a déplacement de l'équilibre en faveur de la forme C_5. Cette dernière semble donc être la forme thermodynamiquement la moins stable.

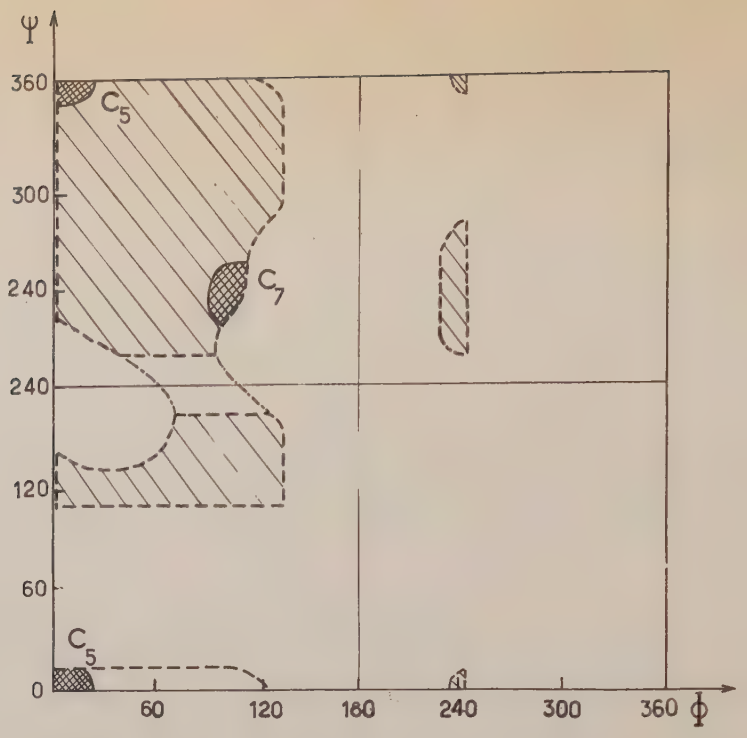


Fig. 5 - Carte conformationnelle pour une paire d'unités peptidiques avec un radical $R_1 = CH_3$ (alanyl) selon Ramachandran (5).

zone stériquement permise

zone favorable à l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires.

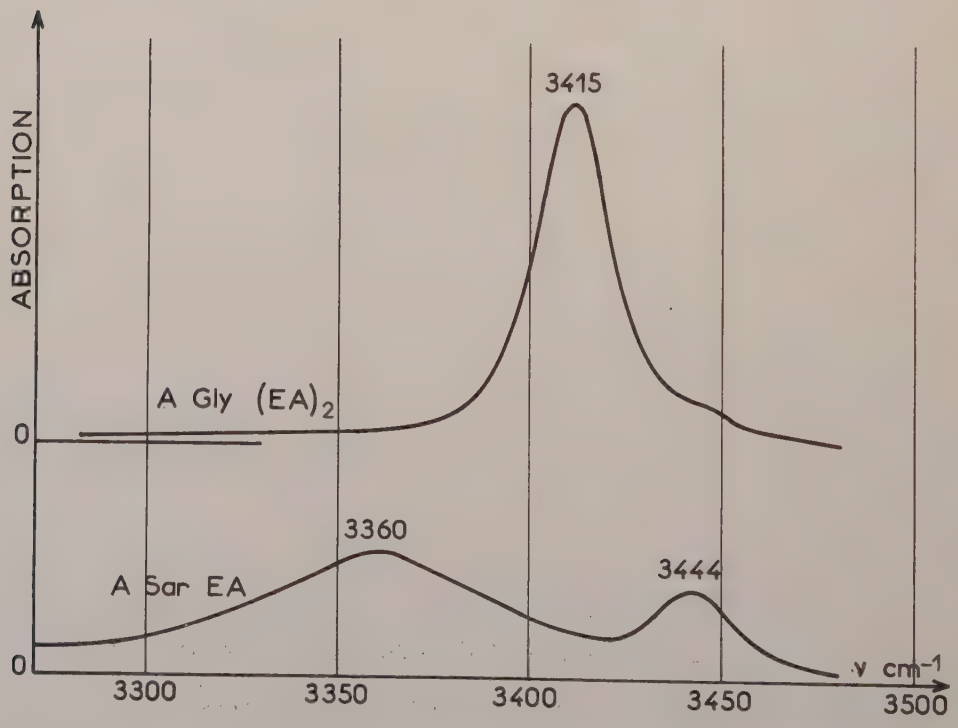


Fig. 6 - Absorptions ν(N-H) des dipeptides $AGly(EA)_2$ (type III) et ASarEA (type II) en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone.

$c = 1,5 . 10^{-4}$ M/l t = 25° C.

Il est intéressant de remarquer que les fréquences des bandes correspondant aux vibrateurs NH chélatés peuvent varier légèrement d'un composé à l'autre bien que se situant dans des régions spectrales assez restreintes. Ces faibles variations sont liées aux basicités et acidités relatives des groupes C = 0 et N-H mis en jeu dans la chélation. Pour la molécule A Gly $(EA)_2$ par exemple, la fréquence de la bande provenant du vibrateur NH chélaté en C_5 est de 3 415 cm^{-1} alors que dans la plupart des dipeptides de type I elle est de 3 422 cm^{-1}. Ceci est dû au fait que le groupement carbonyle est d'autant plus basique qu'il appartient à une fonction amide substituée plusieurs fois (20).

Signalons enfin que le spectre du composé A Gly $(EA)_2$ présente un faible épaulement vers 3 460 cm^{-1} dont l'intensité augmente par élévation de température. Cet épaulement doit correspondre à un vibrateur NH libre d'une conformation semi-étendue provenant de la déchélation du cycle C_5. Il est possible qu'une telle forme existe en très faible proportion pour les dipeptides de type I. Nous pensons que cette conformation se situe au voisinage de la zone correspondant à des angles Φ et Ψ légèrement supérieurs à zéro; en effet dans ce cas la très faible tension stérique, rencontrée lorsque la molécule est totalement étendue, n'existe plus (6).

I,1,3 - Influence des radicaux latéraux (R_1) et terminaux (R_2)

Ainsi que nous l'avons vu, les absorptions correspondant aux groupements NH "chélatés" se situent vers 3 350 et 3 420 cm^{-1}. Les bandes de haute fréquence proviennent alors des vibrateurs NH "libres". La fréquence et le nombre de ces bandes sont variables suivant le composé (fig.1). Nous constatons qu'il existe seulement trois types de profil pour tous les dipeptides étudiés. Ainsi nous notons pour A Gly MA ($R_1 = H$, $R_2 = CH_3$), une absorption à 3 460 cm^{-1} tandis que A Gly EA ($R_1 = H$, $R_2 = C_2H_5$) qui diffère simplement du précédent par la nature de R_2, présente deux absorptions à 3 460 et 3 445 cm^{-1}; les ARMA ($R_1 \neq H$, $R_2 = CH_3$) ont pour leur part deux bandes à 3 460 et 3 445 cm^{-1} tandis que les AREA ($R_1 \neq H$, $R_2 = C_2H_5$) n'en possèdent qu'une située à 3 445 cm^{-1}. Ces observations permettent de rejeter aussi l'attribution de Mizuchima et coll. (12). Elles suggèrent par contre que la bande "libre" de plus haute fréquence correspond dans tous les cas au vibrateur NH ne possédant pas d'atome de carbone paraffinique en position β par rapport à l'atome d'azote tandis que l'autre absorption provient de groupements NH moins libres possé-

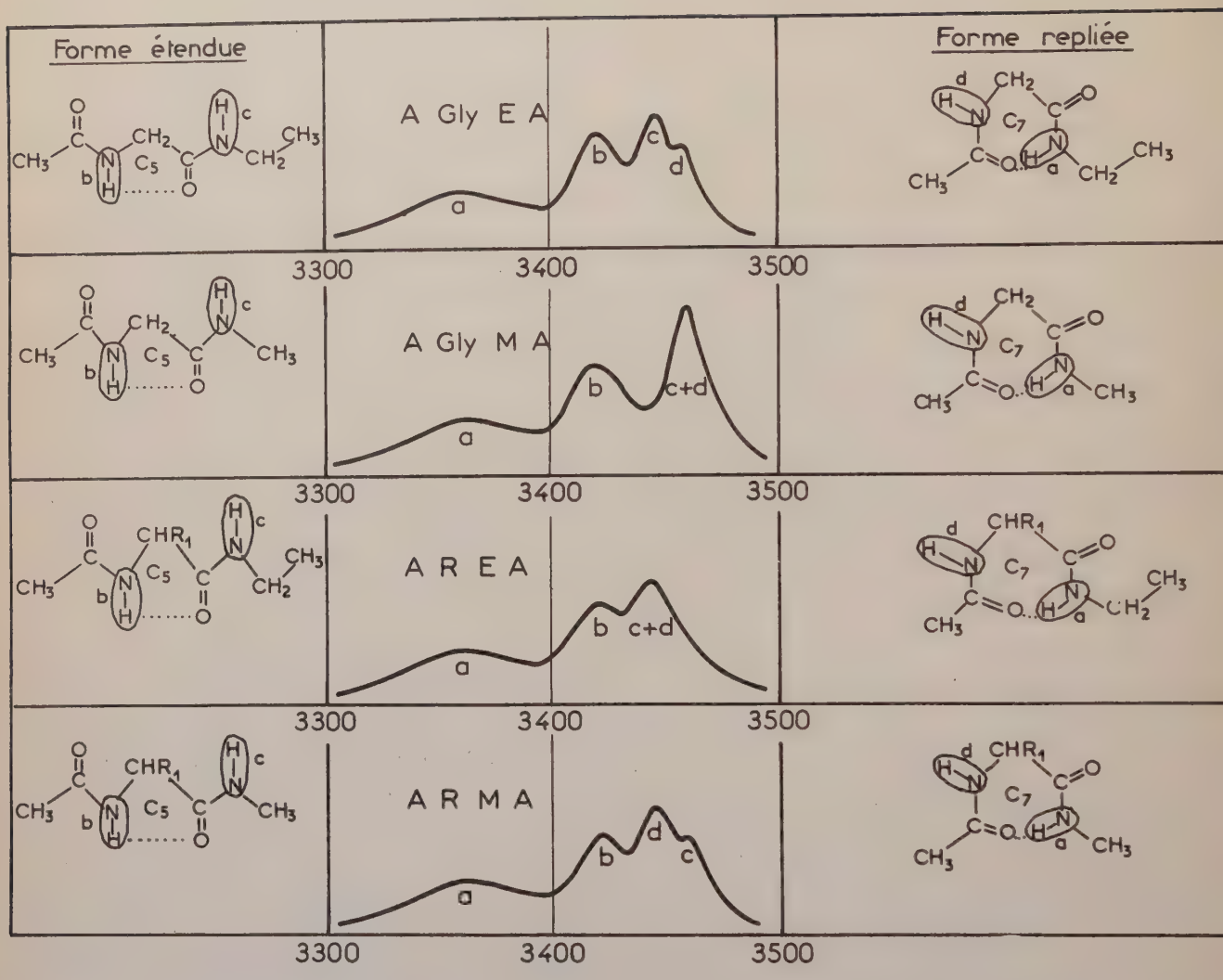


Fig. 7 - Attributions récapitulatives des absorptions ν(N-H) des conformères C_5 et C_7 en fonction de la nature des radicaux R_1 et R_2.

dant un carbone paraffinique en β . Ces considérations nous conduisent à attribuer d'une manière cohérente tous les spectres observés par nous même et par Mizushima et coll. La figure 7 résume notre interprétation.

Quand R_1 = H et R_2 = CH_3, aucun carbone tétraédrique ne se trouve en position β par rapport aux vibrateurs NH, les deux bandes NH (c) de la forme C_5 et NH (d) de la forme C_7 sont superposées à 3 460 cm^{-1}. Lorsque $R_1 \neq H$ et $R_2 \neq CH_3$, les deux groupements NH libres possèdent des carbones tétraédriques en β ; ils absorbent donc vers 3 445 cm^{-1}.

Quand R_1 = H et $R_2 \neq CH_3$, la bande située à 3 460 cm^{-1} correspond au vibrateur NH (d) sans carbone en β et l'autre à 3 445 cm^{-1} provient du groupement NH (c) avec carbone en β . Enfin, dans le cas où $R_1 \neq H$ et $R_2 = CH_3$, cette dernière attribution est inversée pour garder la même règle.

Il semble donc possible, grâce à cette systématique, de prévoir le nombre et la fréquence des bandes d'absorption ν (NH) des dipeptides en fonction de la nature des radicaux R_1 et R_2.

Il est intéressant de rapprocher cet effet d'abaissement de fréquence observé pour un vibrateur NH libre possédant un carbone tétraédrique en β de l'azote à celui du même ordre de grandeur rencontré avec les amides secondaires. Ainsi le N-Méthylacétamide (NMA: CH_3-CONH-CH_3) présente en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone une bande (N-H) libre à 3 475 cm^{-1}, tandis que celle du N-Ethylacétamide (NEA: CH_3-CONH-C_2H_5) est située à 3 461 cm^{-1}.

I,1,4 - Influence de la deutériation sur le spectre des dipeptides en solution.

Nous venons d'analyser le spectre des dipeptides en relation avec leurs conformations. Il nous a semblé utile d'effectuer la même étude sur leurs dérivés N deutériés. Nous pensons en effet que cette analyse doit nous permettre d'une part de confirmer l'attribution des absorptions ν (N-H) et d'autre part de connaître éventuellement l'influence de la liaison deutérium sur les conformations.

Lorsqu'on augmente le taux de deutériation sur les atomes d'azote des dipeptides étudiés, les absorptions situées dans la région de 3 400 cm^{-1} disparaissent progressivement alors qu'apparaissent vers 2 500 cm^{-1} de nouvel-

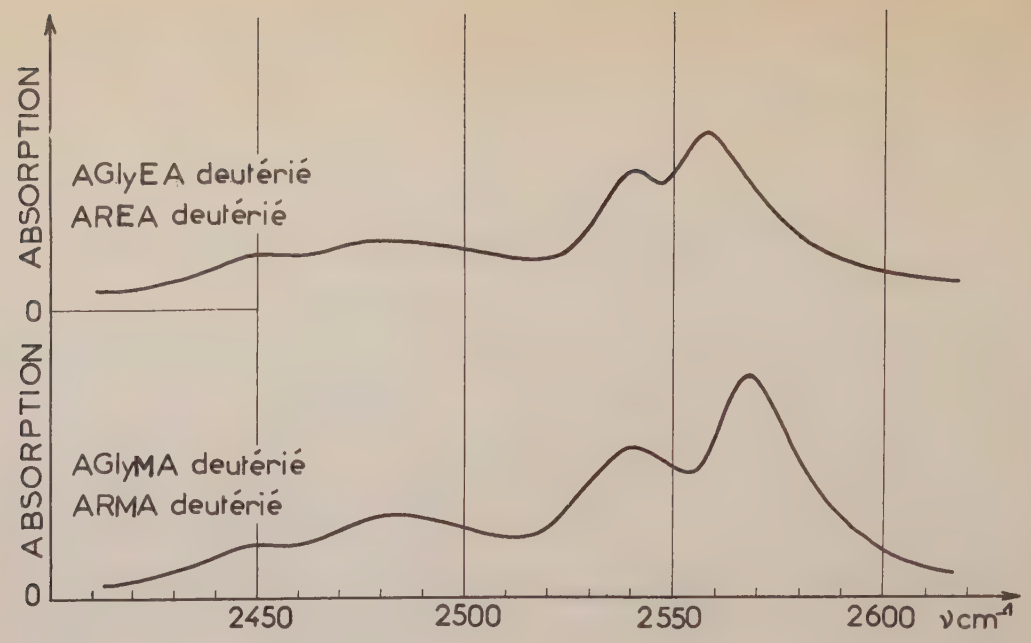


Fig. 8 - Profil spectral des dipeptides N-deutériés CH_3-COND-CHR_1-COND-R_2 en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone, dans la région ν(N-D).

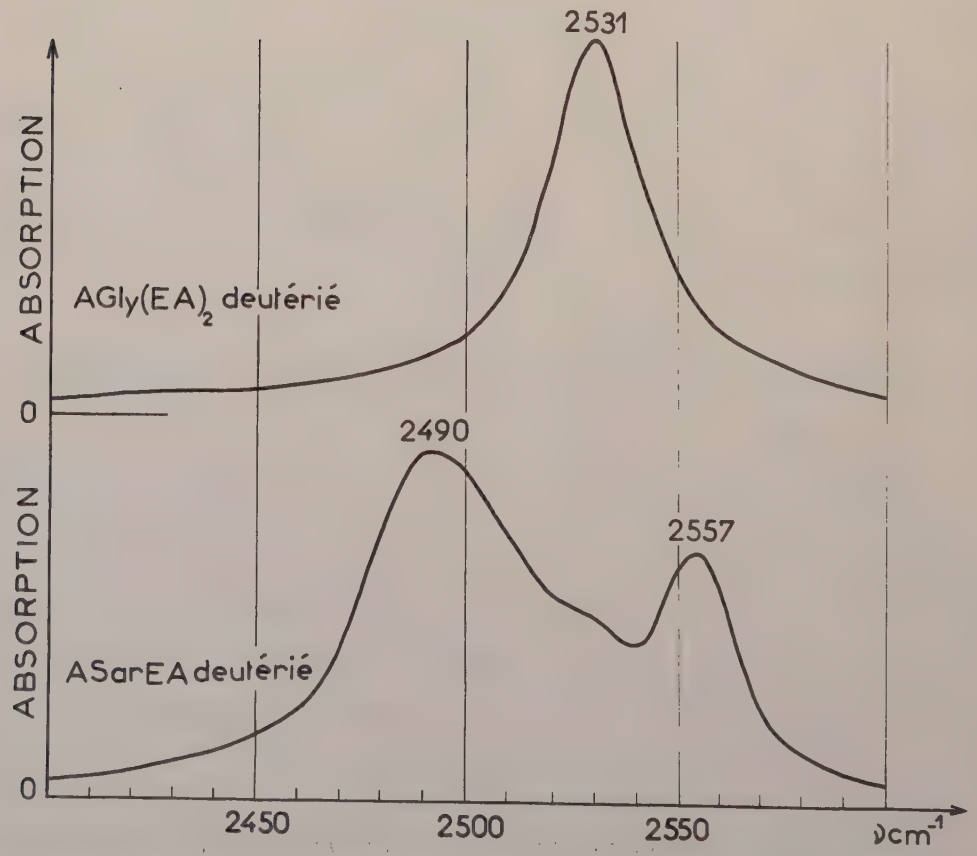


Fig. 9 - Absorptions ν(N-D) des dipeptides $AGly(EA)_2$ N-deutérié et ASarEA N-deutérié en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone.

les bandes attribuées aux vibrateurs (ND). Les spectres enregistrés dans ce domaine pour les solutions diluées des composés I, II, III N- deutériés dans le tétrachlorure de carbone sont représentés dans les figures 8 et 9 et les fréquences sont résumées dans le tableau II.

Tableau II - Fréquences d'absorption ν (ND) en cm^{-1} des dipeptides N-deutériés en solution diluée dans CCl_4 à 25°C ($C = 10^{-4}$ Mole/litre).

COMPOSES	N-D CHELATES		N-D LIBRES	
	C_7	C_5	L_β	L_α
A Gly MA	2 498	2 543		2 568
A Nor MA	2 484	2 538		2 568
A Gly EA	2 490	2 538	2 557	
A Ala EA	2 482	2 540	2 558	
A Sar EA	2 490		2 557	
A Gly $(EA)_2$		2 531		
BAM				2 566

Nous observons dans l'ensemble des profils analogues à ceux déjà mentionnés pour le massif ν (N-H). Dans le cas des solutions diluées, l'analogie avec le spectre des dérivés hydrogénés permet de maintenir la même attribution. Ainsi, la bande large située vers 2 490 cm^{-1} correspond aux vibrateurs N-D chélatés suivant le cycle 7 et celle vers 2 540 cm^{-1} à la forme C_5. D'après les intensités relatives de ces deux bandes, la proportion entre les deux conformères C_5 et C_7 paraît identique, que les dipeptides soient hydrogénés ou N-deutériés.

En ce qui concerne les effets des radicaux R_1 et R_2 sur les bandes libres, nous pouvons faire un certain nombre de remarques. Lorsque $R_1 = H$ et $R_2 = CH_3$, le massif situé vers 2 568 cm^{-1} est attribué aux deux vibrateurs N-D (c) et (d) ne possédant pas de carbone tétraédrique en β de l'atome d'azote. Quand $R_1 \neq H$ et $R_2 = C_2H_5$, le massif situé vers 2 557 cm^{-1} est assigné aux deux vibrateurs N-D (c) et (d) possédant un carbone en β . Nous retrouvons bien ici, à un facteur isotopique près, l'écart de fréquence déjà mentionné. Cependant, lorsque $R_1 \neq H$ et $R_2 = CH_3$ ou $R_1 = H$ et $R_2 = C_2H_5$, nous n'avons pu observer le dédoublement du massif ν (ND) libre. Nous pensons que ce manque de résolution provient de la largeur anormalement élevée des

bandes ν (ND) de ces dipeptides. Cet élargissement anormal est également observable dans le cas des amides secondaires N-deutériés. Signalons par exemple que pour le N-Méthylacétamide $\delta\nu_{1/2}$ (NH) = 14 cm^{-1} et $\delta\nu_{1/2}$(ND)= 34 cm^{-1} alors que la substitution isotopique laisserait prévoir un rétrécissement dans le rapport $1/\sqrt{2}$. Il en est de même pour le N-Ethylacétamide: $\delta\nu_{1/2}$ (NH) = 17 cm^{-1} et $\delta\nu_{1/2}$ (ND) = 31 cm^{-1}. Dans ces conditions il est impossible de séparer deux bandes distantes d'une douzaine de cm^{-1} alors que leur demi-largeur est de l'ordre de 30 cm^{-1}. Les massifs observés dans les deux derniers cas considérés (ARMA et A Gly EA) doivent donc correspondre à la superposition des bandes non résolues provenant des vibrateurs N-D (c) et (d) avec et sans atome de carbone paraffinique en β . Notons enfin que la fréquence du maximum du massif non résolu dépend de l'intensité relative de ses deux composantes et par conséquent de la proportion d'isomères C_5 et C_7 en équilibre dans la solution.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'AUTOASSOCIATION ET DE LA COMPLEXATION SUR LE SPECTRE ET LA CONFORMATION DES DIPEPTIDES

Dans le chapitre précédent, nous avons proposé une attribution du spectre des dipeptides en relation avec leurs conformations en solution très diluée dans un solvant quasi inerte, le tétrachlorure de carbone. A des concentrations plus élevées, le nombre des bandes et leur intensité relative varient d'une manière notable (10, 11, 12). Ceci provient de l'autoassociation des dipeptides par liaisons hydrogène intermoléculaires. Il nous a donc paru intéressant de préciser l'influence de cette autoassociation sur le spectre et sur la conformation de ces molécules et de la comparer à celle de la complexation avec des solvants donneurs et accepteurs de proton.

I,2,1 - Liaisons hydrogène intermoléculaires ou autoassociation des dipeptides.

Nous avons enregistré à 25°C le spectre d'un certain nombre de composés I en solution dans le tétrachlorure de carbone à des concentrations variant entre 6×10^{-4} Mole/litre et 3×10^{-5} Mole/litre. Nous observons alors que par dilution le massif d'absorption de basse fréquence disparait au profit des bandes de haute fréquence. On peut déduire de ce fait que, pour les solutions concentrées, le massif intense situé vers 3 320 cm^{-1} correspond aux espèces autoassociées. On sait en effet que des liaisons hydrogène peuvent s'établir entre molécules différentes du dipeptide, par exemple, selon le schéma:

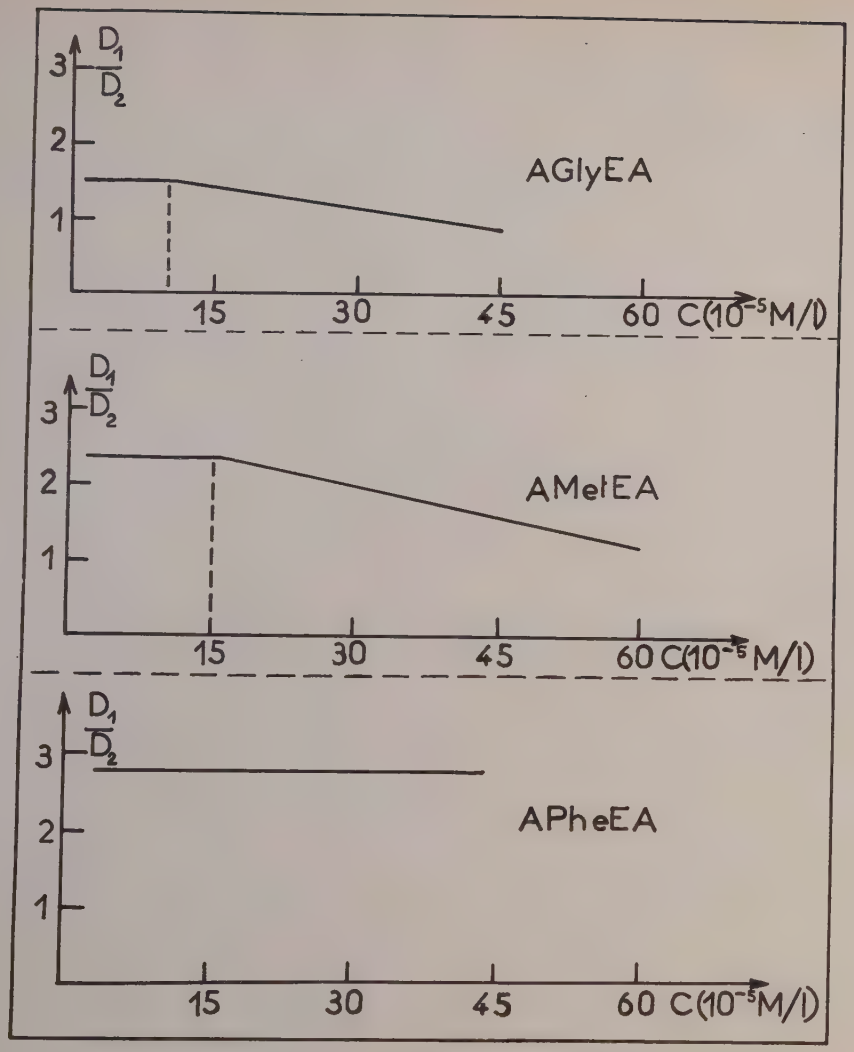


Fig. 10 - Effet de dilution sur le spectre de quelques dipeptides en solution dans le tétrachlorure de carbone.

D_1 : densité optique au maximum de la bande C_5

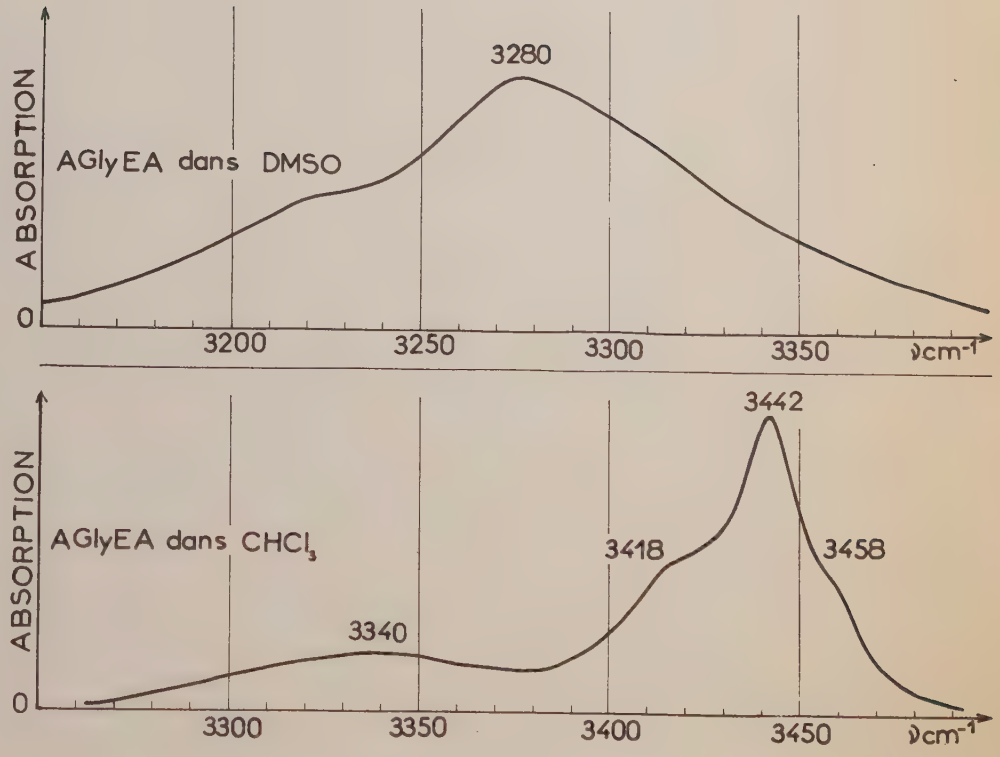
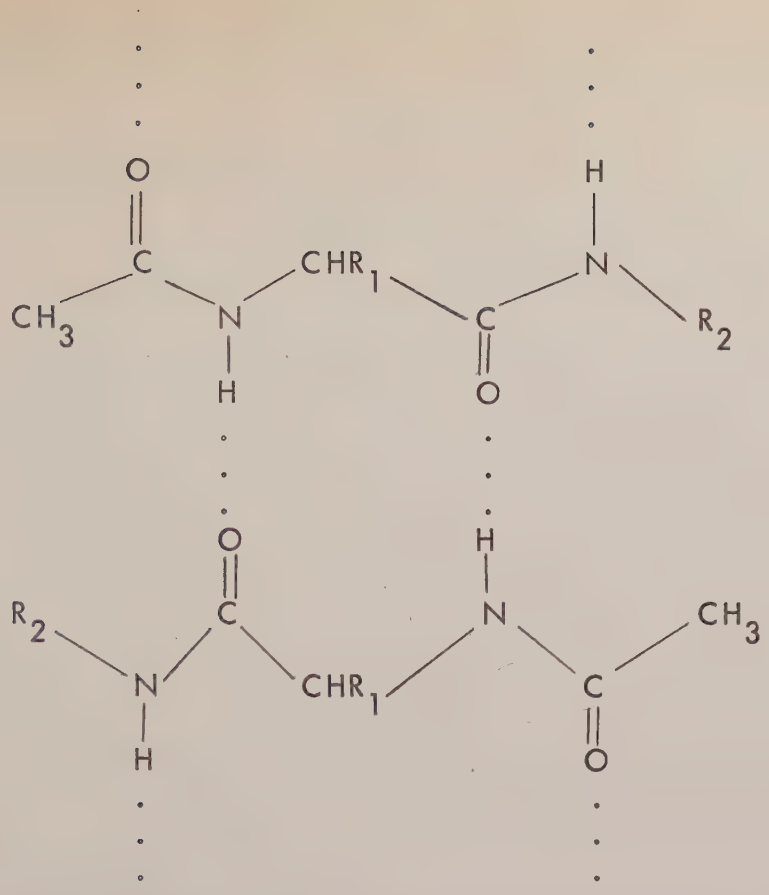


Fig. 11 - Absorptions ν(N-H) de AGlyEA en solution dans le diméthylsulfoxyde et le chloroforme.

c : 10^{-3} M/l.



Selon le dipeptide considéré, le profil du spectre ne varie plus par dilution à partir d'une certaine concentration. Ceci implique que l'on est alors en présence des espèces monomoléculaires. La mesure des densités optiques relatives des bandes de vibrations de valence ν (N-H) en fonction de la concentration (fig. 10) a permis d'évaluer la force de l'autoassociation de ces molécules. Pour tous les dipeptides étudiés on peut noter que cette force est assez grande si on la compare par exemple à celle des amides R-CONH-R_1 qui se dissocient totalement en monomolécules dès la concentration de 2.10^{-3} Mole/litre.

Nos résultats ont en outre rendu possible l'appréciation de l'influence stérique du radical R_1. En effet, comme on peut s'y attendre, plus ce radical devient encombrant et plus le pouvoir d'autoassociation s'affaiblit. Ainsi A Phe EA n'est plus autoassocié à 3.10^{-4} Mole/litre tandis qu'il faut atteindre $1,5.10^{-4}$ Mole/litre avec A Met EA et 10^{-4} Mole/litre avec A Gly EA pour voir disparaître ce phénomène d'autoassociation à 25°C. Nous pouvons confirmer dès à présent que l'absorption centrée vers 3 320 cm^{-1} qui disparait par effet de dilution correspond bien aux vibrateurs NH engagés dans une liaison hydrogène N-H...O = C. Notons qu'en solution concentrée, les bandes ν (N-H) libres tendent à disparaitre et qu'à l'état condensé (cf. 2ème partie) seule persiste

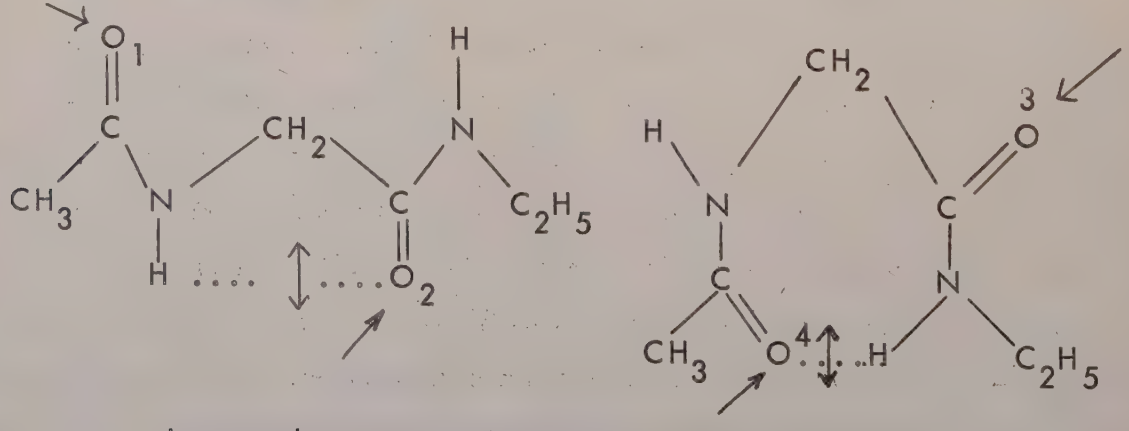
l'absorption large de basse fréquence, vers 3 300 cm^{-1}, ce qui indique que l'autoassociation tend à placer le dipeptide dans une conformation étendue.

I,2,2 - Influence des solvants donneurs et accepteurs de protons sur le spectre et sur la conformation des dipeptides.

Nous venons d'exposer un certain nombre de résultats concernant les dipeptides en solution dans le tétrachlorure de carbone qui est un solvant relativement inerte. En fait, le profil des bandes d'absorption, et en conséquence la proportion des différents conformères, varie suivant la nature du solvant. Etant donné le caractère amphotère de telles molécules, nous avons retenu, pour étudier ces variations, un solvant donneur de proton et un solvant accepteur de proton. La molécule A Gly EA, (CH_3-CONH-CH_2-CONH-C_2H_5) a été choisie comme exemple pour cette étude.

Influence d'un donneur de proton: le chloroforme.

Le spectre de A Gly EA en solution diluée dans le chloroforme est présenté sur la figure 11. Nous trouvons le même nombre de bandes que dans le tétrachlorure de carbone avec toutefois des intensités relatives différentes et des fréquences légèrement abaissées par suite de la polarité supérieure de ce solvant par rapport à CCl_4 (21, 22). On observe aussi une diminution du massif "chélaté" au profit du massif "libre". En outre, il semble que cette diminution soit plus forte dans le cas de la bande C_7 que dans celui de C_5. Ces variations peuvent s'expliquer par la fixation du chloroforme sur les différents groupements carbonyles, cette complexation entrainant parfois une déchélation des cycles C_5 et C_7. Les molécules de chloroforme peuvent en effet se fixer sur quatre sites différents:



La complexation sur les atomes d'oxygène O_1 et O_3 reste sans effe sur le spectre car elle n'entraine pas de variation dans la proportion relative de

deux conformères C_5 et C_7. Par contre, si le chloroforme se fixe sur les sites O_2 et O_4, il y a possibilité de déchélation des cycles. Dans le premier cas, la proportion de C_5 diminue bien que la molécule reste en conformation étendue; dans le second cas, le cycle C_7 se rompt en faveur de cette dernière. Ceci explique pourquoi la bande située vers 3 340 cm^{-1} diminue beaucoup plus que celle située à 3 418 cm^{-1}.

Influence d'un solvant accepteur de proton: le diméthylsulfoxyde (DMSO)

Le spectre de A Gly EA dissous dans un mélange CCl_4 + DMSO varie fortement dans la région ν (NH) en fonction de la concentration de l'accepteur de proton. Lorsque cette dernière augmente, l'absorption située vers 3 320 cm^{-1} se déplace vers les basses fréquences tandis que son intensité augmente progressivement. En solution dans le diméthylsulfoxyde pur (fig. 11), les bandes libres et chélatées ont pratiquement disparu, et seule persiste une absorption large et intense centrée vers 3 280 cm^{-1}.

Cette évolution s'interprète par l'établissement de liaisons N-H...O = S entre les groupements NH peptidiques et l'accepteur. Cette complexation entraine une déchélation des cycles C_5 et C_7. Nous pensons que les molécules de dipeptides sont alors entièrement solvatées en conformation étendue.

CHAPITRE III

DOSAGE DES CONFORMERES DES DIPEPTIDES EN SOLUTION

Nous avons montré que les dipeptides présentent essentiellement deux conformations en solution, l'une "étendue" (C_5), l'autre "repliée" (C_7). Une forme semi-étendue légèrement contractée peut aussi être mise en évidence dans certains cas, mais reste néanmoins en quantité négligeable.

Dans ces conditions, il nous a paru intéressant d'effectuer une évaluation quantitative de la proportion de ces conformères en solution très diluée.

I,3,1 - Principe de la méthode.

Comme dans tous les dosages effectués par spectrométrie d'absorption, nous supposerons que le coefficient d'extinction molaire ε de chaque bande ν(NH) est indépendant de la proportion des conformères en équilibre dans la solution. Rappelons que $\varepsilon_\nu = \frac{D_\nu}{C \times l}$, D_ν étant la densité optique de la bande considérée à la fréquence ν , C la concentration en Mole/litre et l la longueur de la cuve en centimètre. Nous supposerons en outre que le même type de vibrateur NH possède le même coefficient d'extinction molaire pour les différents dipeptides de structure très voisine. Comme il existe essentiellement deux conformères dans notre cas, il nous suffit de connaître le coefficient ε_ν au maximum de l'une des bandes caractéristiques d'une conformation. La proportion de l'autre est alors connue immédiatement par différence.

Bien que les spectres présentent au maximum quatre bandes, on distingue six sortes d'absorptions, d'où six coefficients d'extinction molaire caractéristiques:

1°) vibrateur NH chélaté suivant un cycle C_5 : ε_{C_5}

2°) vibrateur NH chélaté suivant un cycle C_7: ε_{C_7}

3°) vibrateur NH libre d'une forme C_5 ne possédant pas de C_β : $\varepsilon_{L\alpha\ C_5}$

ex: A Gly MA ou ARMA

4°) vibrateur NH libre d'une forme C_5 possédant un C_β : $\varepsilon_{L\beta\ C_5}$

ex: A Gly EA ou AREA

5°) vibrateur NH libre d'une forme C_7 ne possédant pas de C_β : $\varepsilon_{L\alpha\ C_7}$

ex: A Gly MA ou A Gly EA

6°) vibrateur NH libre d'une forme C_7 possédant un C_β : $\varepsilon_{L\beta\ C_7}$

ex: ARMA ou AREA

Les quatre derniers coefficients d'extinction molaire ne sont pas directement utilisables car ils présentent une ambiguité due à l'inversion des bandes L_α et L_β des formes C_5 et C_7 lorsque l'on passe d'un composé à un autre. De plus, aucun d'entre eux ne peut être connu à partir d'une mesure absolue.

Il nous reste donc le choix entre ε_{C_5} et ε_{C_7}. Le composé A Gly $(EA)_2$ fournit la solution à ce problème car il est, comme nous l'avons vu, presque complètement sous forme C_5 et son spectre ne présente qu'une seule bande vers 3 415 cm^{-1} (fig. 6). Nous pouvons donc en déduire la valeur de ε_{C_5}.

Il est maintenant possible d'effectuer le dosage: à l'aide de ε_{C_5} connu, on calcule la quantité de forme C_5 grâce à la mesure du coefficient d'extinction molaire ε_{C_5} du peptide considéré et on en déduit, par différence, la quantité du conformère C_7.

Théoriquement, il est possible, à partir de la quantité de forme C_7 ainsi déterminée, d'évaluer ε_{C_7} qui pourrait éventuellement servir à d'autres dosages. Cette démarche serait néanmoins assez délicate car la bande C_7 est très large et d'autre part il faudrait opérer en solution extrêmement diluée pour éviter la superposition éventuelle de la bande ν (NH) autoassociée qui pourrait fausser les mesures.

Avant toute détermination expérimentale, il est intéressant de connaître la limite de la précision que l'on peut obtenir. Nous pouvons négliger les erreurs gravimétriques liées à la préparation des solutions. Nous devons par con-

tre tenir compte d'une part de l'incertitude sur la courbe donnée par le spectromètre (bien que celui-ci ait été soigneusement étalonné en absorption grâce à l'emploi d'atténuateurs de référence) et d'autre part et surtout de l'erreur liée à la décomposition graphique du massif d'absorption. Signalons au passage que la précision la plus grande est obtenue avec la bande C_5. Le calcul d'incertitude effectué dans ces conditions conduit à des erreurs de $\pm$ 15 % sur la proportion des conformères.

1,3,2 - Applications et vérifications de la méthode.

Dans tous les cas, nous avons opéré dans le tétrachlorure de carbone à 50°C avec des concentrations de $1,5.10^{-4}$ Mole/litre pour éviter toute autoassociation.

a) Cas des dipeptides présentant quatre bandes ν (NH) .

Les solutions de A Gly EA et ARMA présentent à elles deux les six types de bandes décrits précédemment. La mesure de ε_{C_5} nous permet dans les deux cas de calculer la proportion de C_5 et de déduire celle de C_7. A partir de ces valeurs nous pouvons calculer le coefficient d'extinction molaire des bandes libres. ARMA nous fournit $L_{\alpha C_5}$ et $L_{\beta C_7}$ tandis que A Gly EA permet de connaître $L_{\alpha C_7}$ et $L_{\beta C_5}$.

La connaissance de ces valeurs nous permettra de vérifier l'autocohérence de la méthode comme nous le verrons dans l'exemple suivant.

b) Cas des dipeptides présentant trois bandes ν (NH).

C'est le cas de A Gly MA et AREA. Nous avons déterminé précédemment la proportion de C_5 et C_7, puis nous avons évalué pour AREA la somme des absorptions dues à $L_{\beta C_5}$ et $L_{\alpha C_7}$.

Nous constatons qu'il y a pratiquement superposition des spectres ainsi reconstitués avec les spectres expérimentaux, l'autocohérence de la méthode se révèle donc assez satisfaisante.

I,3,3 - Discussion des résultats.

Nos résultats sont rassemblés dans les tableaux ci-dessous:

Désignation de la bande	ε en $l.Mole^{-1}.cm^{-1}$
C_5	135
$L_\alpha C_5$	266
$L_\alpha C_7$	100
$L_\beta C_5$	166
$L_\beta C_7$	117

Dipeptide	C_5 %	C_7%
A Gly $(EA)_2$	100	0
A Nor MA	30 ± 15	70 ± 15
A Gly EA	52 ± 15	48 ± 15
A Gly MA	40 ± 15	60 ± 15
A Ala EA	26 ± 15	74 ± 15

Remarquons, comme on pouvait s'y attendre, que les dipeptides possédant un radical encombrant ont une tendance plus forte à se cycliser. L'examen des modèles moléculaires montre en effet que, pour cette forme C_7, la chaîne latérale en position équatoriale n'est pas en interaction de Van der Waals avec les autres groupements alors qu'elle s'y trouve plus facilement dans le cas d'une forme étendue type C_5.

En résumé:

Nous avons étudié dans cette partie le spectre infrarouge des dipeptides CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2 en solution dans le tétrachlorure de carbone et dans des solvants donneurs et accepteurs de proton. Les modifications du spectre par effets de dilution, de température et de substitutions sélectives sur les atomes d'azote nous ont permis de montrer qu'il existe pour ces molécules

deux conformations en équilibre en solution diluée dans un solvant inerte: l'une comporte un cycle de chélation à 5 chaînons (forme étendue) et l'autre un cycle à 7 chaînons (forme repliée). La confrontation avec les résultats des calculs conformationnels semi-empiriques montre une cohérence très satisfaisante.

Nous avons, en outre, pu observer qu'en solution dans un solvant donneur ou accepteur de protons les dipeptides se présentent de préférence en conformation étendue.

Nous avons proposé enfin une méthode de dosage qui permet pour le première fois d'évaluer les proportions des conformères de dipeptides en solution. Lors de cette évaluation nous avons constaté que les molécules possédant un radical central (R_1) encombrant ont une tendance plus marquée que les autres à se replier.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE SPECTROSCOPIQUE ET STRUCTURALE

DES OLIGOPEPTIDES $R-CO(NH-CHR_1-CO)_n NH-R_2$ A L'ETAT CONDENSE

INTRODUCTION -

Les oligopeptides constituent les modèles les plus simples grâce auxquels on peut espérer préciser certaines caractéristiques du mode d'enchaînement des résidus α -amino acide dans le but de posséder une meilleure connaissance de la structure secondaire des polypeptides et des protéines.

Dans cette optique, l'étude du spectre de vibration de ces oligomères peut conduire à identifier leurs différentes structures à condition d'avoir fait au préalable une attribution complète de leurs bandes d'absorption.

Quelques rares travaux de ce type ont été relevés dans la littérature. Nous pouvons signaler en particulier ceux de Mizuchima et coll. (23) et, plus récemment, ceux de Koyama et Shimanouchi (24) portant sur l'acétyl-glycine-N-méthylamide (A Gly MA) ainsi que les résultats obtenus dans notre laboratoire par Grenié (25) sur les spectres infrarouges des oligoglycines et des oligo-L-alanines bipolaires de la forme $^{+}H_3N\ (CHR\text{-}CONH)_m CHR\text{-}COO^{-}$.

Dans cette partie, nous présenterons en premier lieu une attribution du spectre infrarouge des oligopeptides $R\text{-}CO(NH\text{-}CHR_1\text{-}CO)_n NH\text{-}R_2$ et nous essaierons ensuite d'exploiter ces informations dans le but de préciser les conformations que peuvent adopter ces chaînes à l'état condensé, en liaison avec les éléments de structure obtenus par diffraction des rayons X.

CHAPITRE I

ATTRIBUTION DU SPECTRE INFRAROUGE DES OLIGOGLYCINES CH_3-CO(NH-CH_2-CO)$_n$NH-C_2H_5, (A Gly_nEA), A L'ETAT SOLIDE

L'absence de données sur la structure cristalline des oligopeptides du type A Gly_nEA nous a conduit à effectuer une tentative d'identification des conformations de ces chaînes par spectroscopie infrarouge.

Avant d'effectuer ce travail qui est essentiellement fondé sur des méthodes comparatives, il nous semble indispensable de faire une attribution aussi complète que possible du spectre de ces composés.

Dans ce chapitre, nous présenterons successivement notre méthode d'attribution, nos résultats expérimentaux et enfin notre interprétation que nous analyserons région par région.

II,1,1 - Méthode d'attribution.

Notre méthode consiste à tester successivement un certain nombre de critères couramment utilisés lorsque l'on veut donner une interprétation empirique aux spectres observés.

Dans le cas des oligopeptides étudiés, ces critères sont les suivants:

a) Approximation des vibrations de groupe.

Si nous voulons suivre l'évolution des absorptions depuis les premiers termes jusqu'au polymère, nous devons effectuer notre analyse en tenant compte des différents groupes d'atomes que l'on retrouve dans toutes les molécules étudiées. On sait en effet que si, théoriquement, chaque mode de vibration normale fait intervenir un déplacement de tous les atomes de la molécule, ces derniers ne vibrent pas tous avec la même amplitude et ne sont donc pas tous

affectés de la même manière pour une vibration donnée. Souvent en effet la majeure partie de l'énergie potentielle de vibration est localisée dans un groupe d'atomes particulier. Dans cette hypothèse de la localisation des vibrations, nous pourrons donc analyser le spectre des oligopeptides en suivant l'évolution des absorptions caractéristiques de chaque groupement: motif peptidique -CONH-, groupe méthylène $-C_{\alpha}H_2-$ et bouts de chaine $-CH_3$ et $-C_2H_5$.

b) Evolution du spectre par allongement de la chaine (n croissant)

Il parait raisonnable de penser que l'intensité relative des bandes correspondant aux bouts de chaine diminue lorsque la longueur de cette dernière augmente. Par contre, les absorptions caractéristiques de l'enchainement peptidique doivent devenir rapidement prépondérantes.

c) Comparaison des composés hydrogénés et N-deutériés.

Lorsque l'on substitue l'hydrogène par le deutérium sur un atome d'azote, on attend tout d'abord un déplacement de fréquence très important pour les absorptions propres de ce vibrateur, ensuite une modification éventuelle des couplages faisant intervenir les vibrations précédentes, et enfin une perturbation au niveau des mouvements de squelette par suite de l'augmentation de la masse effective des groupements deutériés.

d) Comparaison avec des composés modèles.

Les spectres infrarouges des A Gly_nEA ont été comparés avec ceux de certains composés modèles comme le N-méthylacétamide $CH_3-CONH-CH_3$ (NMA) et l'acétylglycine N-méthylamide $CH_3-CONH-CH_2-CONH-CH_3$ (A Gly MA) qui ont fait l'objet de nombreux travaux (23, 24, 26 à 32). En vue d'attribuer les vibrations caractéristiques des groupements terminaux, nous avons utilisé en outre les dérivés suivants:

- Le N- éthyl acétamide

$CH_3-CONH-C_2H_5$ (NEA)

- L'acétyl sarcosine N-éthylamide

$CH_3-CON(CH_3)-CH_2-CONH-C_2H_5$ (A Sar EA)

- L'acétylglycine N- diéthylamide

$CH_3-CONH-CH_2-CON(C_2H_5)_2$ (A $Gly(EA)_2$)

- Le bis acétamido-méthylène

$CH_3-CONH-CH_2-NHCO-CH_3$ (BAM)

Signalons cependant que nous n'utiliserons pas ces derniers modèles pour attribuer les absorptions du groupement amide. En effet, l'intensité et la fréquence de ces bandes sont très sensibles à la conformation de la molécule ainsi que nous le verrons par la suite.

e) Influence de l'état physique et de la température.

Certaines absorptions sont très sensibles à des effets d'environnement et de température. Nous utiliserons cette propriété en comparant les spectres des oligopeptides hydrogénès et N-deutériés obtenus à l'état liquide et à l'état solide, à la température ordinaire (25°C) et à celle de l'azote liquide (-180°C).

II,1,2 - Résultats expérimentaux.

Les spectres infrarouges des oligopeptides N-éthylés (A Gly_nEA) et de la polyglycine II (PG II) hydrogénée et N-deutériée à l'état solide à température ordinaire sont représentés sur les figures 12 et 13; les figures 14 et 15 reproduisent les absorptions des molécules modèles NEA, A Sar EA, A Gly $(EA)_2$ et BAM, hydrogénées et N- deutériées.

II, 1, 3 - Interprétation.

a) Généralités.

Les attributions que nous proposons pour les A Gly_nEA ainsi que pour la PG II sont résumées dans les tableaux III et IV.

En ce qui concerne la dénomination des bandes amides, nous utiliserons une notation devenue maintenant habituelle (2).

Amides A et B: mettant en jeu la vibration de valence ν (N-H)

Amide I: principalement vibration de valence ν (C=O)

Amide II: vibration de déformation dans le plan δ (N-H) couplée avec la vibration de valence ν (C-N)

Amide II' : vibration de valence ν (C-N) dans les molécules N-deutériées

Amide III: en grande partie ν (C-N) couplée avec la vibration δ (N-H)

Amide III': déformation δ (N-D) dans le plan

Amide IV : déformation δ (C=O) dans le plan

Amide V : déformation γ (N-H) hors du plan

Amide V' : déformation γ (N-D) hors du plan

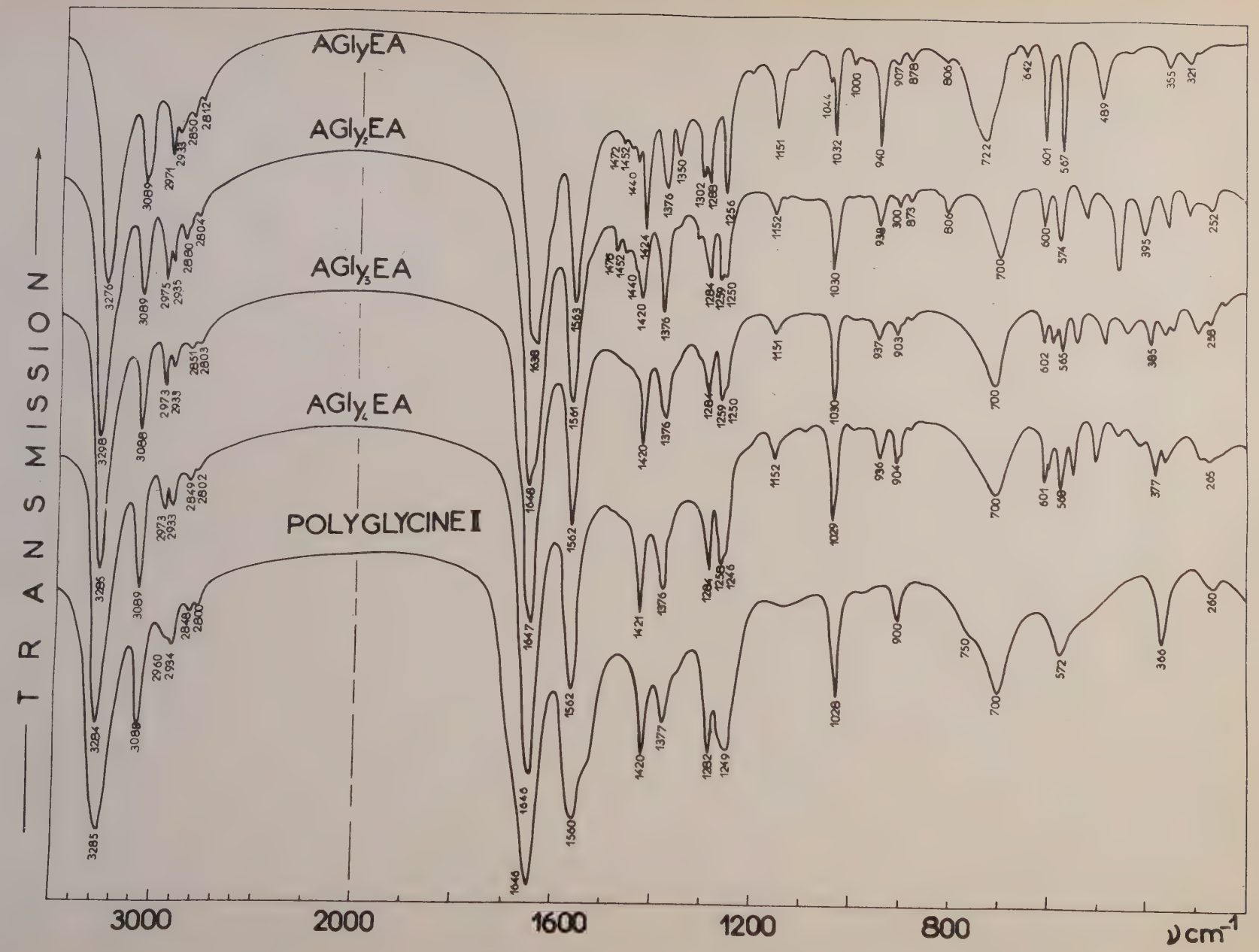


Fig. 12 - Spectres infrarouges des oligoglycines (AGly$_n$EA) et de la polyglycine II (PGII)

TABLEAU III - Attribution du spectre infrarouge des oligoglycines $AGly_nEA$ et de la polyglycine II de 4000 à 200 cm^{-1}.

AGlyEA	$AGly_2EA$	$AGly_3EA$	$AGly_4EA$	PG II	Attributions
3276	3298	3285	3284	3285	Amide A
3089	3089	3088	3089	3088	Amide B
2971	2975	2973	2973		$\nu_a(CH_3)$
				2960	
2933	2935	2933	2933	2934	$\nu_a(C_\alpha H_2)$
	2880				
2850	2855 ep.	2851	2849	2848	$\nu_s(C_\alpha H_2)$
2812	2804	2803	2802	2800	$2.\delta^{C_\alpha}(CH_2)$
1650	1648	1647	1646	1646	Amide I $\nu(C=O)$
1638	1637	1640			
1563	1561	1562	1562	1560	Amide II $\delta(NH)+\nu(C-N)$
1472	1476				$\delta(CH_2)$ Ethyl
1452	1459				}
1440	1441				$\delta(CH_3)$
1424	1420	1420	1421	1420	$\delta(C_\alpha H_2)$
1384 ep.	1384 ep.	1383 ep.	1383 ep.		
1376	1376	1376	1376	1377	$\gamma(CH_2)+III_b[\delta(NH)+\nu(C-N)]$ / $\delta_s(CH_3)+III_a[\delta(NH)+\nu(C-N)]$
1350	1345 ep.				$\gamma(CH_2)$ Ethyl
1302	1308				$\delta_s(CH_3)+III_a[\delta(N-H)+\nu(C-N)]$
1288	1284	1284	1284	1282	$\gamma(CH_2)+III_b[\delta(N-H)+\nu(C-N)]$
1256	1259 / 1250	1259 / 1250	1258 / 1246	1249	$t(CH_2)$
1205					
1151	1152	1151	1152		ν_a (C-C-N) Ethyl
1130	1129				$r(CH_3)$
1117			1072		
1044					$r(CH_3)$
1032	1030	1030	1029	1028	$\nu_a(C'C_\alpha N)$
1000	998				
940	938	937	936		$r(CH_2)$ Ethyl
907	900	903	904	900	$r(C_\alpha H_2)$
878	873	875	874		$\nu(C-C)$
806	806				$\nu(C-C)$
750 ep.	760 ep.	760 ep.	760 ep.	750	Amide IV_b $\delta(C=O)$
720	720 ep.	720 ep.	720 ep.		Amide V_a $\delta(N-H)$
	700	700	700	700	Amide V_b $\delta(N-H)$
642					Amide IV_a $\delta(C=O)$
601	600	602	601		Amide VI_a $\gamma(C=O)$
		584	592		
567	574	565	568	572	Amide VI_b $\gamma(C=O)$
		534	544		
489	517				
			497		
		476			
	448		454		
		431			
	395		402		déformations du squelette
		385	377		
360 / 355	351	353 / 388	352	366	
321	304	288	284		
291					
	252	258	265	260	Amide VII t (C'-N)
		232	245		} torsions du squelette

TRANSMISSION
3000
2000
1600
1200
800
400 cm⁻¹
AGlyEA
A Gly2 EA
A Gly3 EA
A Gly4 EA
POLYGLYCINE II
1634
1635
1641
1631
2415
2468
2423
2470
2412
2454
1477
1418
1417
1352
1350
1277
1264
1276
1265
1030
1022
985
1025
1035
932
931
890
680
643
518
375
381
522
644
740
533
508
646
740
520
641
740
1028
987
931
1034
1018
994
933
1276
1275
1354
1355
1379
1417
1423
1476
1419
1353
1276
1265
1487
1476
1485
1475
1025
985
366
521
261

TABLEAU IV - Attribution du spectre infrarouge des oligoglycines N deutériées et de la polyglycine II N deutériée de 2500 à 200 cm^{-1}.

AGlyEA	$AGly_2EA$	$AGly_3EA$	$AGly_4EA$	PG II	Attributions
2474	2470	2468	2468	2468	Am II' + Am III' plan "b"
2454	2450				Am II' + Am III' plan "a"
2412	2423	2415	2415	2415	ν(N-D)
1672	1672	1675	1673		
1631	1641 1624	1635	1634	1634	Amide I ν(C=O)
1510					
1485	1486	1487	—— *		Amide II' ν(C-N)
1475	1476	1476		1477	
1453					$\delta_a(CH_3)$
1417	1423	1419	1417	1418	$\delta(C_\alpha H_2)$
1379		1385	——		$\delta_s(CH_3)$ Ethyl
1366			——		$\delta_s(CH_3)$ Acétyl
1355	1355 1350	1353	1350	1352	$\gamma(C_\alpha H_2)$
1276	1275	1276	1276	1277	$t(C_\alpha H_2)$
		1265	1265	1264	
1156	1152				ν_a (C-C-N) Ethyl
	1036 ep.	1035	1030	1033	ν_a (C-C_α-N)
1034	1028	1026	1022	1025	
1018	1018	1016 ep.			Amide III' δ(N-D)
994	987	985	985	985	Amide III_b^a δ(N-D)
	963				
933	931	932	931		r(CH_2) Ethyl
890	890	891	891	890	r($C_\alpha H_2$)
	863				
800	800	788	——	805 ep.	ν(C-C)
740	740	740	——	680	Amide IV_b δ(C=O)
641	646	644	643		Amide IV_a δ(C=O)
			614		
				570	Amide VI
520	533 508	522	545 518	521	Amide V' γ(N-D)
481					
		465			
	442				déformations du squelette
	415				
	395	381	375		
				366	
354	350	352	355		
		334			torsions du squelette
315					
289		288			
		258		261	

* : —— Région spectrale non étudiée

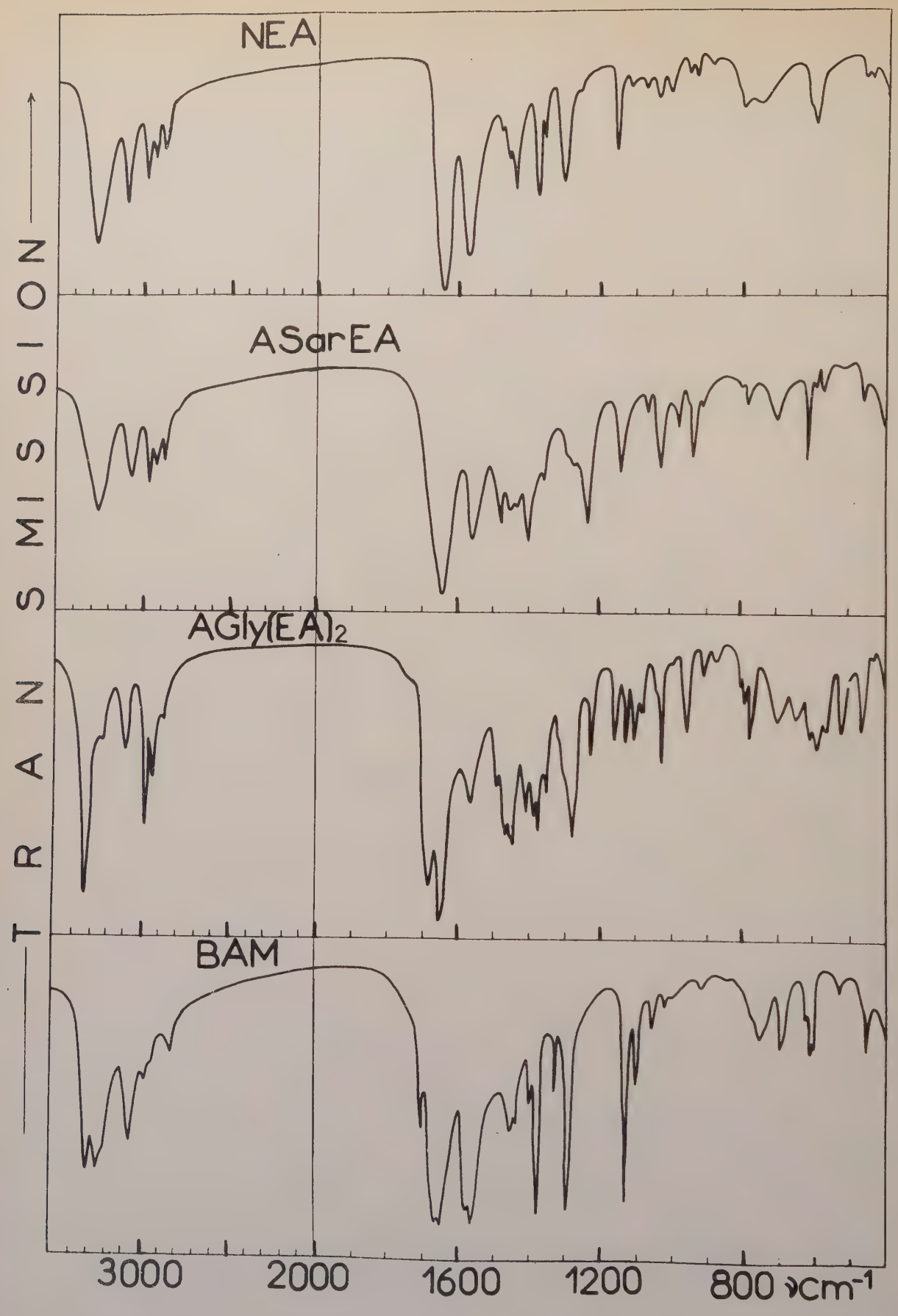


Fig. 14 - Spectres infrarouges de CH_3-CONH-C_2H_5(NEA), CH_3-CON(CH_3)-CH_2-CONH-C_2H_5(ASarEA), CH_3-CONH-CH_2-CON(C_2H_5)$_2$ (AGly(EA)$_2$) et CH_3-CONH-CH_2-NHCO-CH_3 (BAM) à l'état solide entre 3500 et 400 cm^{-1}.

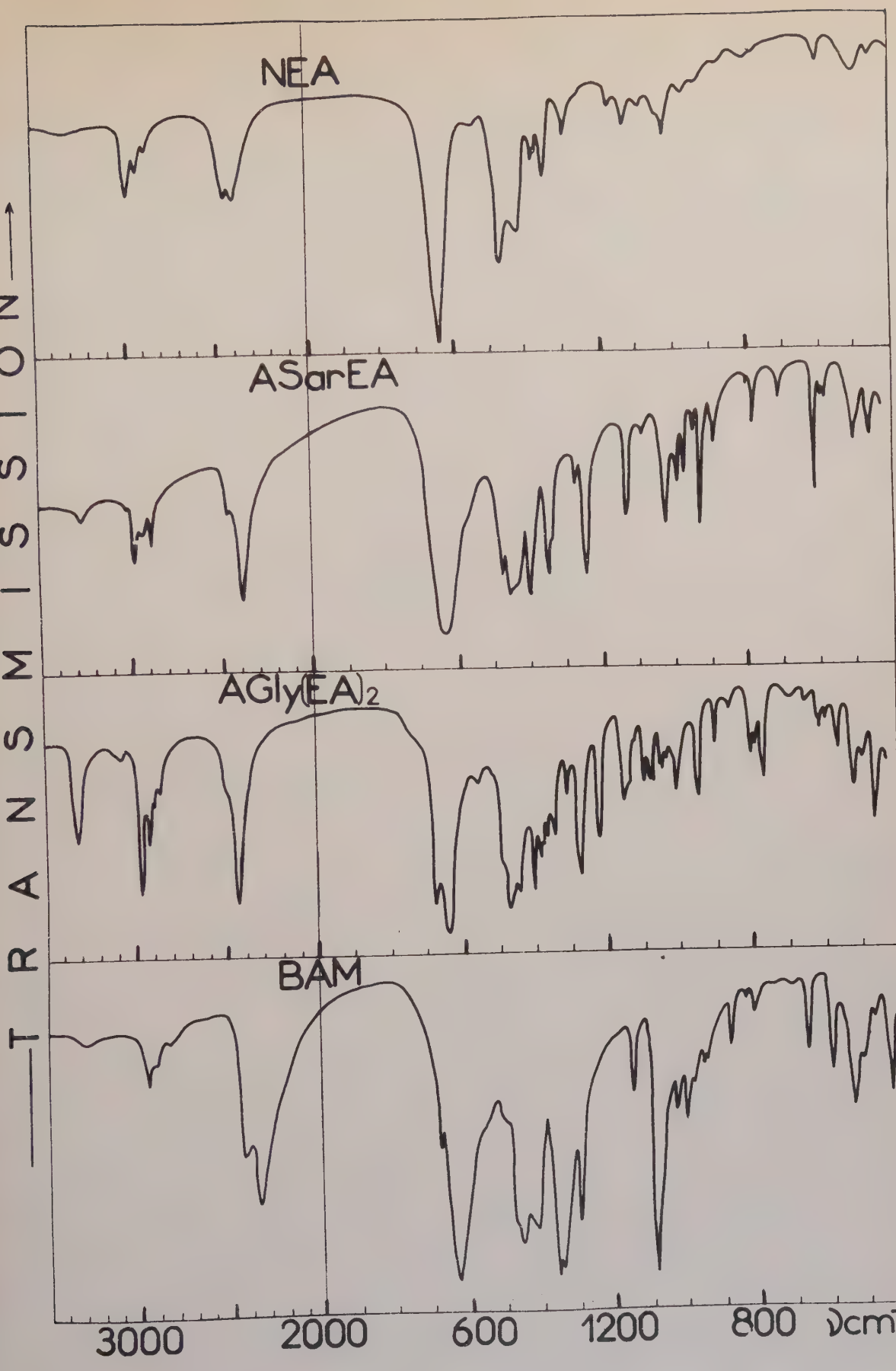
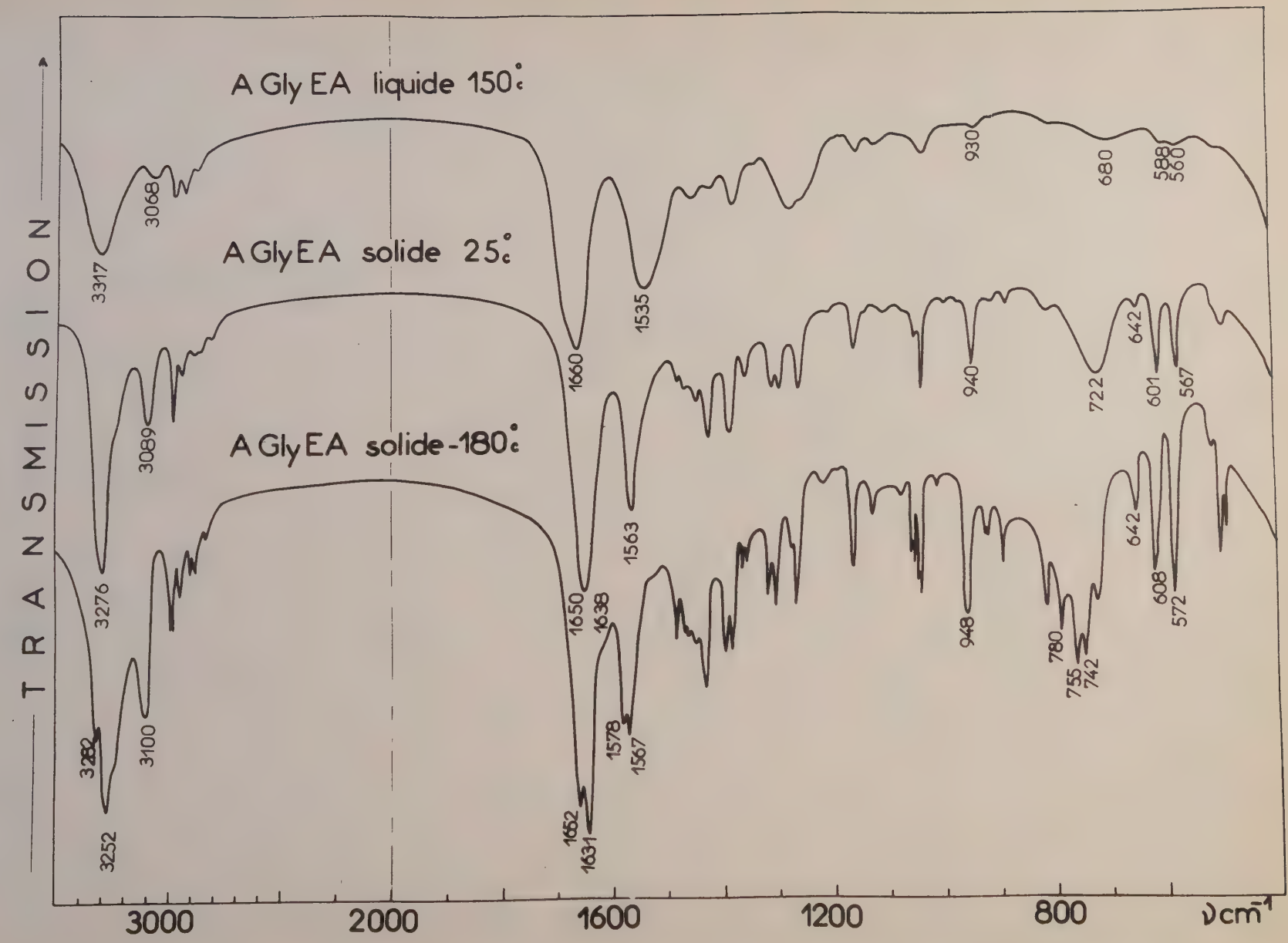


Fig. 15 - Spectres infrarouges de CH_3-COND-C_2H_5 (NEA N-deutérié), CH_3-CON(CH_3)-CH_2-COND-C_2H_5 (ASarEA N-deutérié), CH_3-COND-CH_2-CON $(C_2H_5)_2$ (AGly $(EA)_2$ N-deutérié) et CH_3-COND-CH_2-NDCO-CH_3 (BAM N-deutérié) à l'état solide entre 3500 et 400 cm^{-1}.


A Gly EA liquide 150°
A Gly EA solide 25°
A Gly EA solide -180°
TRANSMISSION
3317
3068
1660
1535
930
680
588
560
3089
940
722
642
601
567
3276
3252
3282
3100
1650
1638
1631
1652
1578
1567
1563
948
780
755
742
642
608
572
3000
2000
1600
1200
800
ν cm⁻¹

Amide VI : déformation γ (C=O) hors du plan

Amide VII: torsion autour de la liaison C-N peptidique, t (C-N).

Nous utiliserons aussi les notations de Koyama et Shimanouchi (24) pour différencier les unités peptidiques dans la chaine. L'unité de début de chaîne CH_3-CONH-C_α sera appelée "a", l'unité C_α -CONH-C_α qui se répète le long de la chaine: "b".

b) Région 3500 - 3000 cm^{-1} (fig. 12)

Les absorptions situées vers 3300 et 3100 cm^{-1} sont attribuées sans ambiguité aux bandes caractéristiques Amide A et Amide B. Il est bien admis (42) que ces deux absorptions proviennent de la résonance de Fermi entre la vibration de valence ν (N-H) et la première harmonique de l'oscillation Amide II. Elles disparaissent en effet toutes les deux par deutériation sur l'azote. Les intensités relatives de ces deux bandes dépendent de la position de l'absorption Amide II qui est très sensible à l'état physique, à la température et à la nature du radical R_1, attaché à l'atome de carbone central (C_α). Si nous comparons en effet les spectres de A Gly EA liquide à 150°C et cristallisé à température ordinaire et à -180°C (fig. 16), nous voyons que la bande Amide A se déplace de 3317 cm^{-1} à 3252 cm^{-1} tandis que le large massif amide II situé à 1535 cm^{-1} à 150°C se dédouble à -180°C en deux composantes observées à 1578 et 1567 cm^{-1}. Cette évolution s'accompagne d'une forte augmentation d'intensité de la bande amide B qui s'explique par une résonance de Fermi plus forte lorsque la fréquence de la vibration amide II croît. Il est cependant plus délicat de conclure en examinant les écarts entre les absorptions amides A et B, car on connait mal l'effet de la température et de l'état physique sur la fréquence de la vibration ν (N-H). Nous verrons plus loin l'interprétation que l'on peut donner de ce phénomène en termes de conformation.

c) Région 3000 - 2800 cm^{-1} (fig. 12).

C'est le domaine des vibrations de valence ν (C-H). Dans la série des A Gly_n EA, nous observons en général quatre absorptions, vers 2970, 2933, 2850 et 2800 cm^{-1}.

Les deux bandes à 2933 et 2850 cm^{-1} sont attribuées aux mouvements $\nu_a(C_\alpha H_2)$ et $\nu_s(C_\alpha H_2)$ par analogie avec PG II (33). L'absorption intense

située vers 2970 cm^{-1} que l'on trouve dans le spectre de A Gly MA et dans celui de tous les composés modèles étudiés est due à la vibration $\nu_a(CH_3)$ des différents groupements méthyl de bout de chaîne. La vibration $\nu_s(CH_3)$, attendue vers 2870 cm^{-1}, est vraisemblablement située à 2850 cm^{-1}, superposée à la bande $\nu_s(C_\alpha H_2)$. L'absorption peu intense vers 2800 cm^{-1}, qui est aussi présente dans le spectre de PG II, provient certainement de l'harmonique de la déformation $\delta(C_\alpha H_2)$.

Krimm et Kuroiwa (34) ont proposé une interprétation pour les bandes faibles observées vers 2977 et 2805 cm^{-1} dans le spectre de la polyglycine II en considérant que certains groupements méthylène $-C_\alpha H_2$ étaient perturbés par la présence de liaisons C-H...O = C' semblables à celles qui ont été mises en évidence dans la structure du collagène. Il est très possible que ce composé soit stabilisé par des liaisons de ce type mais la preuve spectroscopique avancée par ces auteurs semble peu vraisemblable.

d) Région 2500 - 2000 cm^{-1} (fig.13).

Les A Gly_n EA N-deutériées présentent dans la région de la vibration de valence ν (N-D) trois absorptions principales situées vers 2415, 2450 et 2470 cm^{-1}. Nous attribuons la première au mouvement ν(N-D). Les deux dernières proviennent, comme dans le cas du N-méthylacétamide (30), de la combinaison Amide III' + Amide II'. L'absorption située à 2450 cm^{-1}, dont l'intensité diminue lorsque n augmente et qui n'apparait plus à partir du tétrapeptide, est due à la combinaison Amide III' + Amide II' du plan "a". Par contre, la bande que l'on observe vers 2470 cm^{-1} et qui est visible dans le spectre de la polyglycine II N-deutériée correspond à la combinaison analogue du plan "b".

Cette interprétation sera confirmée par la suite lors de l'étude de la bande Amide III'.

e) Région 1700 - 1500 cm^{-1} (fig. 12 et 13) .

L'absorption très intense située vers 1645 cm^{-1} est attribuée à la bande Amide I. En fait, cette absorption présente deux sous-maximums à 1640 et 1650 cm^{-1}. La bande de plus basse fréquence est plus intense dans les premiers termes; elle disparait ensuite lorsque n augmente, tandis que l'autre devient prépondérante et se retrouve à 1646 cm^{-1} dans le spectre de la polyglycine II. Plusieurs interprétations de ce comportement sont également possibles. Nous en discuterons dans le chapitre suivant.

A 1563 cm^{-1}, nous observons une absorption large et intense qui est attribuée au mouvement Amide II. Elle disparait entièrement par N-deutériation. Cette absorption, bien que très sensible à l'influence de la température, de l'état physique et de la conformation, reste à une fréquence pratiquement fixe (1563 cm^{-1}) pour tous les A Gly_n EA et pour la PG II à température ordinaire.

f) Région 1500 - 1400 cm^{-1} (fig. 12 et 13).

Les vibrations $\delta (CH_3)$ et $\delta (CH_2)$ sont attendues dans cette région ainsi que la bande amide II' des dérivés N-deutériés.

Cette dernière présente deux sous-maximums situés à 1476 et 1487 cm^{-1} pour les premiers termes. Elle est observée à 1477 cm^{-1} dans le spectre de la polyglycine II N- deutériée.

En ce qui concerne les dérivés hydrogénés, nous observons trois absorptions dont l'intensité diminue lorsque n augmente et qui ne sont plus visibles à partir du tétrapeptide, et une quatrième, toujours intense, située vers 1420 cm^{-1}. Nous faisons correspondre la bande à 1472 cm^{-1} à la vibration de déformation $\delta (CH_2)$ du groupement C_2H_5 par comparaison avec les alcanes et aussi parce que cette bande est absente des spectres des modèles N-méthylés (NMA, BAM et A Gly MA). Les différentes déformations antisymétriques dans le plan et hors du plan des groupements méthyl provenant des deux bouts de chaine sont responsables des absorptions situées à 1452 et 1440 cm^{-1}.

La bande intense à 1420 cm^{-1} qui se retrouve dans tous les composés hydrogénés et N-deutériés est attribuée à la vibration de déformation $\delta (C_\alpha H_2)$ du milieu de chaine, conformément à l'interprétation de Koyama et Schimanouchi (24) qui observent cette même bande dans toutes les espèces isotopiques de l'A Gly MA sauf dans le dérivé deutérié sur le carbone C_α. Suzuki et coll. (33) attribuent de la même manière l'absorption située à 1420 cm^{-1} dans le spectre de la polyglycine II.

g) Région 1400 - 1200 cm^{-1} (fig. 12 et 13).

L'analyse de cette région est rendue très délicate car de forts couplages sont attendus entre les vibrations Amide III, $\delta_s (CH_3)$, $\gamma (CH_2)$ et $t (CH_2)$. Toutefois, les changements obtenus dans les spectres par deutériation sur l'azote et les interprétations déjà connues dans le cas de A Gly MA (24) et de PG II (33) guideront notre analyse.

En premier lieu, notons que la bande à 1350 cm^{-1} disparaît lorsque n augmente dans les A Gly_n EA hydrogénés (fig.12). Par contre, une absorption située à la même fréquence est observée dans tous les A Gly_n EA N-deutériés ainsi que dans PG II deutériée (fig. 13) . Elle n'existe ni dans les molécules modèle N-méthylées hydrogénées (A Gly MA, NMA, BAM), ni dans PG II hydrogénée, mais tous les modèles N-éthylés tels que NEA, A Sar EA, A Gly $(EA)_2$, hydrogénés et N-deutériés (fig.14 et 15) absorbent à cette fréquence. Nous attribuons cette absorption au balancement γ (CH_2) de bout de chaine pour les A Gly_n EA hydrogénés et au mouvement γ $(C_\alpha H_2)$ de milieu de chaine dans les A Gly_n EA N-deutériés et PG II N-deutériée. Ces observations nous montrent que la vibration γ $(C_\alpha H_2)$ est fortement couplée dans les A Gly_n EA et PG II hydrogénés.

Le massif presque toujours dédoublé situé vers 1250 cm^{-1} dans les A Gly_n EA N-deutériés est attribué aux vibrations de torsion t (CH_2) provenant des différents groupements méthylène. Nous attribuons de la même manière les absorptions observées à 1249 cm^{-1} et 1277, 1264 cm^{-1} dans les spectres de PG II hydrogénée et N-deutériée. Cette interprétation est compatible avec l'absence d'une telle bande dans le spectre de A Gly MA deutérié sur le C_α central (24) et de PG II C-deutériée (33). Nous observons à 1379 cm^{-1} une absorption dans le spectre de A Gly EA N-deutérié dont l'intensité décroît quand le nombre d'unités peptidiques croît. Elle correspond à la vibration $\delta_s(CH_3)$ du groupement éthyl de bout de chaîne.

La fréquence intrinsèque de la vibration $\delta_s(CH_3)$ du groupement acétyl se situe vers 1360 $\pm$ 10 cm^{-1} comme le montrent les spectres de différents modèles hydrogénés et N-deutériés et en particulier ceux de BAM et A Sar EA. Les bandes observées à 1376, 1309 et 1284 cm^{-1} dans les spectres de A Gly_nEA et à 1377 et 1282 cm^{-1} dans celui de la polyglycine II résultent alors d'un couplage mettant en jeu les vibrations $\delta_s(CH_3\text{-}C)$ (pour les premiers termes), amide III, et γ $(C_\alpha H_2)$ (fig.17). Nous pouvons l'interpréter d'une façon assez analogue à celle proposée par Koyama et Shimanouchi (24). En effet, la fréquence intrinsèque de la vibration γ $(C_\alpha H_2)$ est située vers 1350 cm^{-1} et celle des mouvements Amide III a et III b respectivement vers 1325 cm^{-1} et 1320 cm^{-1}. Les vibrations $\delta_s(CH_3)$ et III a se couplent pour donner deux composantes (A) à

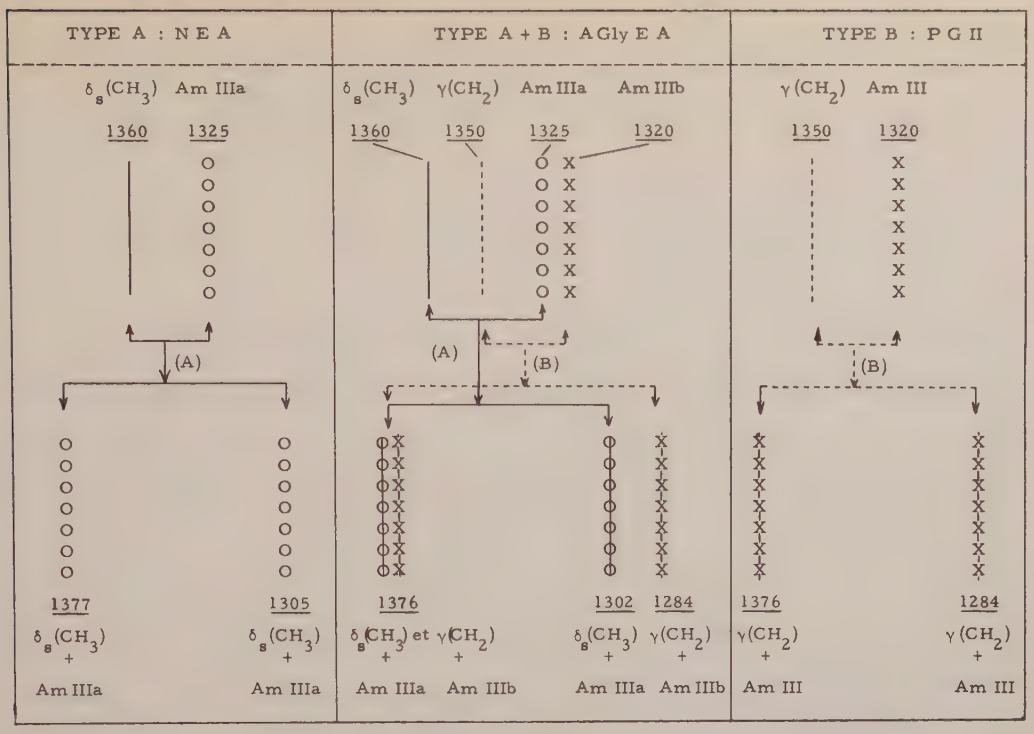


Fig. 17 - Schéma du "couplage" entre les vibrations Amide III, $\delta_s(CH_3)$ et $\gamma(CH_2)$ dans les molécules de NEA, AGlyEA et PG II.

1376 cm^{-1} et 1302 cm^{-1}, tandis que γ ($C_\alpha H_2$) et III b donnent à leur tour deux absorptions (B) situées vers 1284 et 1376 cm^{-1} (fig. 17). Cette explication tient compte de la disposition relative des différents moments de transition de ces mouvements en fonction du modèle PG II que nous discuterons plus loin.

Le couplage A faisant intervenir les groupements acétyl doit disparaître quand n augmente, tandis que les abosrptions résultant du couplage B doivent au contraire devenir prépondérantes et persister dans PG II. Ce comportement est effectivement observé et l'évolution des spectres de NEA, A Gly EA et PG II par N-deutériation confirme cette hypothèse. Dans le spectre de NEA N-deutérié (fig.15), la bande située à 1376 cm^{-1} dont l'intensité diminue fortement par N-deutériation est attribuée à t (CH_2) du groupement éthyl. Le spectre de A Gly EA N-deutérié (fig.13) présente une faible bande à 1366 cm^{-1} qui correspond à $\delta_s(CH_3)$ du groupement acétyl alors que la bande à 1379 cm^{-1} provient, comme nous l'avons déjà vu, de la déformation $\delta_s(CH_3)$ du groupement éthyl. La polyglycine II N-deutériée ne présente aucune absorption entre 1420 et 1350 cm^{-1}, ce qui confirme notre attribution pour les bandes $\delta_s(CH_3)$.

h) Région 1200 - 800 cm^{-1}

Dans ce domaine spectral, nous attendons les différents mouvements de balancement des groupes CH_3 et CH_2, les vibrations de valence du squelette, ainsi que la vibration Amide III' pour les compoés N-deutériés. Nous présenterons l'analyse de cette région en quatre points.

α - Groupement Ethyl (CH_3- CH_2).

Les absorptions provenant du bout de chaîne $-C_2H_5$ doivent être observées aussi bien dans les dérivés hydrogénés que N-deutériés. De plus, nous devons vérifier que leur intensité diminue rapidement lorsque n augmente; c'est ce que nous constatons pour les trois bandes situées vers 1150, 940 et 800 cm^{-1}.

La première correspond à la vibration ν_a(C-C-N). Nous constatons en effet la présence d'une bande semblable dans les spectres de tous les modèles N-éthylés. Par contre, le BAM qui ne possède aucune liaison de type N-C de bout de chaîne n'absorbe pas dans cette région. Le mouvement de balancement r(CH_2) est situé vers 940 cm^{-1}. Effectivement, seuls les spectres des modèles N-éthylés présentent cette absorption. La comparaison entre NEA et NMA confirme cette attribution ainsi que celle de la bande située vers 800 cm^{-1} qui résulte de la vibration de valence ν_s(C-C-N).

β - Groupement acétyl ($CH_3C' = 0$)

Dans cette région, trois bandes proviennent de ce bout de chaîne; deux d'entre elles, situées à 1130 et 1045 cm^{-1} ne sont plus observées dès le tétrapeptide et ne figurent pas dans le spectre de A Gly MA deutérié sur l'atome de carbone du groupement acétyl (24). Nous les attribuons donc aux mouvements de balancement r(CH_3). La troisième, située vers 875 cm^{-1} et qui est la bande la plus intense du spectre Raman de A Gly EA, est assignée pour cette raison à la vibration ν(C-C').

γ - Groupement méthylène central (C_α H_2).

L'absorption intense située vers 1030 cm^{-1} est attribuée à une vibration de squelette faisant intervenir l'enchainement central N-C_α-C'. Nous l'observons à cette fréquence pour tous les composés modèles présentant ce groupement. Cette bande est très peu sensible aux effets de température et reste inchangée par N-deutériation. Elle est observée de la même manière dans

A Gly MA et dans la polyglycine II.

Vers 900 cm^{-1}, une absorption assez large, visible dans les A Gly_n EA et PG II hydrogénés et N-deutériés, est attribuée à un mouvement faisant intervenir à la fois le balancement $r(C_\alpha H_2)$ et les vibrations de valence du squelette.

δ - Bande Amide III' (δ N-D)

Cette absorption est attendue vers 1000 cm^{-1}. Nous observons deux bandes pour A Gly EA N-deutérié. La première, située vers 990 cm^{-1}, persiste lorsque n augmente et se retrouve à 987 cm^{-1} dans le spectre de PG II N-deutériée. Nous l'attribuons au mouvement Amide III' du plan "b". La seconde absorbe à 1018 cm^{-1}. Elle est encore visible à cette fréquence dans le spectre de A Gly_2 EA N-deutérié mais n'est plus observée pour les termes supérieurs. Elle est attribuée à la vibration Amide III' du plan "a". En effet, l'intensité de ces deux bandes diminue de la même manière lorsque l'on compare les spectres obtenus pour des échantillons de A Gly EA présentant des taux de deutériation de plus en plus faibles et disparaissent totalement du spectre de A Gly EA hydrogéné.

Notons que deux absorptions de cette région n'ont pu être encore attribuées. L'une située vers 995 cm^{-1} dans les A Gly_n EA hydrogénés, semble provenir d'un mouvement de bout de chaîne, l'autre vers 1205 cm^{-1} dans A Gly EA peut vraisemblablement être attribuée à la première harmonique de l'absorption située à 602 cm^{-1}.

i) Région 800 - 500 cm^{-1}.

C'est le domaine des absorptions Amide IV, V et VI des différentes unités peptidiques. Nos observations sur les spectres des composés modèles NEA, A Sar EA, A Gly $(EA)_2$ et BAM ainsi que le comportement à - 180°C de certaines bandes des A Gly_n EA et de la polyglycine II, hydrogénés et N-deutériés, confirment parfaitement les attributions que proposent Koyama et Shimanouchi (24) pour A Gly MA dans cette région.

La bande large et intense centrée vers 720 cm^{-1} pour le premier terme correspond à la superposition des absorptions Amide Va, Vb, IVb. Pour les termes supérieurs, on observe une bande intense vers 700 cm^{-1} flanquée d'un épaulement situé vers 750 cm^{-1} qui résultent respectivement des vibra-

tions Vb et IV b.

Par N-deutériation, nous retrouvons les bandes V'a et V'b dans le massif observé vers 520 cm^{-1} et IVb vers 734 cm^{-1}. L'absorption peu intense située à 642 cm^{-1} est insensible à un effet de froid. Elle persiste dans tous les A Gly_n EA N-deutériés, mais disparaît à la température ordinaire dès le tripeptide hydrogéné. Elle correspond à la vibration Amide IVa.

Les vibrations VIa et VIb sont observées vers 600 et 570 cm^{-1}.

Cette analyse nous permet de dresser un tableau des fréquences intrinsèques pour les vibrations Amide IV, V, VI des différentes unités peptidiques:

ν en cm^{-1}:	750	720	700	642	600	570
bandes Amides:	IVb	Va	Vb	IVa	VIa	VIb

j) Région 500 - 60 cm^{-1}.

C'est le domaine des vibrations de déformation et de torsion du squelette ainsi que celui de la vibration de réseau O...H. Cette région est extrêmement complexe à interpréter car les progressions de bandes sont pratiquement impossibles à suivre.

Toutefois, nous pensons pouvoir attribuer la bande amide VII vers 260 cm^{-1} pour tous les A Gly_n EA et la polyglycine II, en accord avec Shimanouchi et coll. (24, 35). Le massif intense que l'on observe vers 360 cm^{-1} dans PG II est alors attribué aux différents mouvements mettant en jeu les déformations des angles C_α C'N, C'NC_α et NC_α C'. Vers 130 cm^{-1}, nous observons, comme dans A Gly MA et NMA (24, 35), une absorption due probablement à une vibration de réseau résultant en particulier de la présence de liaisons hydrogène intermoléculaires NH...O = C.

CHAPITRE II

CONFORMATION DES OLIGOGLYCINES

$CH_3-CO(NH-CH_2-CO)_nNH-C_2H_5$

Si certaines corrélations entre le spectre infrarouge et la structure des polypeptides ont été proposées (36), leur appréciation reste souvent délicate dans le cas des chaînes courtes. Récemment, Koyama et Shimanouchi (24) ont élaboré une méthode qui permet de déterminer par spectroscopie infrarouge les conformations les plus probables de petites molécules contenant le groupement amide -CONH-.

Il nous a paru intéressant de préciser la conformation et la structure des A Gly_n EA à l'état solide à la lumière des différents travaux antérieurs et de l'analyse spectroscopique que nous venons d'exposer.

Dans ce but, après un rappel des généralités sur les polyglycines à l'état solide, nous analyserons les critères qui nous permettront de proposer un modèle de structure pour les oligoglycines d'après nos résultats spectroscopiques. Nous rapprocherons enfin ces données de celles que nous avons obtenues par diffraction des rayons X.

II,2,1 - Observations préliminaires.

La polyglycine peut être obtenue sous deux formes cristallines différentes (PG I et PG II) suivant la méthode de préparation employée. Ces deux formes présentent des spectres infrarouges différents. La polyglycine I possède une structure β en chaînes antiparallèles (37) correspondant au modèle de Pauling et Corey (38). La polyglycine II cristallise selon un réseau hexagonal (fig.18 et 19) dans lequel chaque chaîne possède un axe hélicoïdal d'ordre 3 avec une translation de 3,1 Å par résidu et un motif de répétition suivant l'axe de la chaîne de 9,3 Å (39, 40). Des liaisons hydrogène d'assez courte distance (N... O = 2,76 Å) s'établissent entre les chaînes. Notons cependant

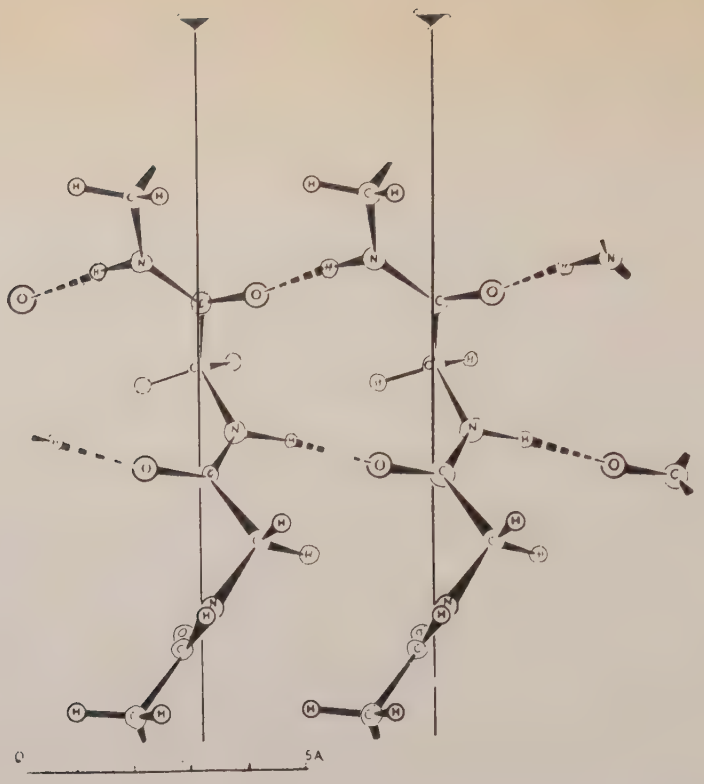


Fig. 18 - Structure de la polyglycine II d'après Crick et Rich (39) : projection suivant la direction des axes hélicoidaux.

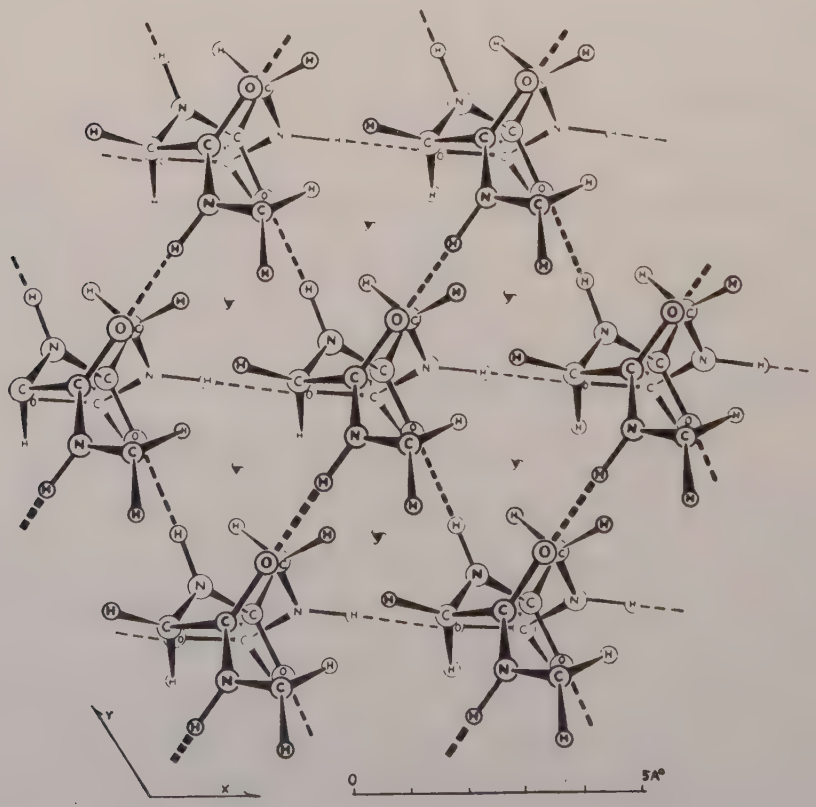


Fig. 19 - Structure de la polyglycine II d'après Crick et Rich (39) : projection suivant la direction perpendiculaire aux axes hélicoidaux.

que le sens des chaînes les unes par rapport aux autres est aléatoire (39, 41).

Dans le cas des oligomères A Gly_n EA, on doit tendre vers l'une ou l'autre de ces structures lorsque n croît. Rappelons que les oligoglycines ioniques $^{+}H_3N\text{-}CH_2(CONH\text{-}CH_2)_mCOO^{-}$ adoptent dès le tripeptide (m = 2) une structure semblable à celle de la polyglycine I (25).

Lorsque l'on compare dans leur totalité les spectres infrarouges des termes homologues des deux séries A Gly_n EA et Gly_m, c'est-à-dire les oligomères possédant le même nombre d'unités peptidiques C_α -CONH-C_α (n = m+1), nous ne relevons aucune ressemblance. Signalons pourtant que lorsque m et n sont assez grands, l'influence des bouts de chaine devient négligeable puisque les bandes provenant de ces groupements ont totalement disparu dès le tétrapeptide. Il existe par contre une très grande analogie dans les fréquences et les intensités relatives des absorptions correspondant aux A Gly_n EA et à la polyglycine II dès les premiers termes.

Ces deux remarques suggèrent que les conformations des Gly_m et des A Gly_n EA sont très différentes, ces derniers composés semblant cristalliser suivant une structure proche de celle de la polyglycine II. L'analyse plus approfondie des spectres nous permettra de confirmer cette hypothèse.

II,2,2 - Spectre infrarouge et conformation des oligoglycines.

Les calculs de Koyama et Shimanouchi (24) ont montré que les absorptions les plus sensibles à la conformation de la chaîne se situent dans les basses régions. Il faut noter toutefois que les vibrations de valence et de déformation correspondant aux groupements N-H et C=O dépendent des liaisons hydrogène intermoléculaires et donc de la structure cristalline.

Compte tenu de ces remarques, nous analyserons plus particulièrement les domaines des vibrations de valence ν (NH), ν (C=O) ainsi que celui des mouvements couplés avec la vibration Amide III.

a) Bandes Amides A et B.

Comme nous l'avons vu, ces deux absorptions situées vers 3280 et 3100 cm^{-1} proviennent de la résonance de Fermi entre les vibrations ν (NH) et la première harmonique de la bande Amide II (42). La fréquence de la vibration

ν (NH) dans A Gly_n EA et PG II est relativement basse par rapport à celle que l'on observe dans Gly_m et PG I bien que la résonance de Fermi, plus forte dans le premier cas, tende à la repousser vers les hautes fréquences. Ces observations montrent que les liaisons hydrogène sont plus fortes dans les A Gly_n EA que dans les Gly_m. C'est ce que l'on attend en comparant les deux modèles PG I et PG II. En effet, la structure β en chaînes antiparallèles est beaucoup moins compacte que la structure PG II. Cette hypothèse est confirmée par la fréquence relativement haute de la bande Amide II des A Gly_n EA et PG II, car bien que cette vibration soit couplée (δ NH + ν CN), l'élévation de fréquence est due uniquement à la contribution de la déformation plane δ (NH). En effet le mouvement Amide II' ν (C-N) absorbe à la même fréquence dans les A Gly_n EA et PG II et dans les Gly_m et PG I (1475 cm^{-1}), tandis que la bande Amide III' δ (N-D) se trouve à une fréquence plus élevée pour les premiers (990 cm^{-1}) que pour les seconds (950 cm^{-1}). Il semble donc que les liaisons hydrogène des A Gly_n EA possèdent des caractéristiques proches de celles qui stabilisent la structure de la polyglycine II.

b) Bande Amide I.

Les corrélations entre les absorptions Amide I et la conformation des chaînes polypeptidiques ont été expliquées théoriquement par Miyazawa (43) à l'aide d'un calcul de perturbation basé sur l'hypothèse de la localisation de la vibration ν (C=O) dans le groupement amide, c'est-à-dire en ne tenant compte que des interactions entre groupements CONH. Nous ne pouvons pas appliquer ce raisonnement de manière simple à une structure de type PG II (44). En effet, si nous supposons que toutes les chaînes sont parallèles, elles peuvent se déduire les unes des autres par simple translation et l'étude des vibrations d'un tel réseau est comparable à celle d'une chaîne isolée. Dans le cas de PG II, nous attendons pour les vibrateurs homologues de la chaîne un mouvement en phase ($\delta = 0$) et un mouvement doublement dégénéré ($\delta = \pm \frac{2\pi}{3}$) puisque celle-ci présente un axe hélicoïdal d'ordre 3. Cependant, Krimm (41) a montré qu'il existait des chaînes antiparallèles dans une telle structure. Nous devons considérer alors une unité structurale constituée d'un système d'au moins deux chaînes antiparallèles liées par liaisons hydrogène. Or nous savons que ce modèle introduit, en plus des mouvements décrits pour la chaîne isolée, des mouvements en phase ($\delta = 0$) et en opposition de phase ($\delta = \pi$) pour les vibrateurs

homologues des deux chaînes en interaction. Ce fait complique considérablement le problème des éclatements observés sur la plupart des bandes Amides et explique pourquoi le calcul théorique de Miyazawa (36) est en désaccord avec ce que l'on observe. Nous pensons pour notre part qu'il est inutile de vouloir expliquer un spectre de PG II dans cette région car les effets précédents peuvent induire des éclatements de fréquence, qu'il est très difficile d'évaluer, d'autant plus qu'un échantillon de polyglycine II n'est jamais totalement exempt de forme I.

Les éclatements de fréquence que l'on observe en particulier pour la bande Amide I des A Gly_n EA proviennent de la non-équivalence des vibrateurs (C = 0) liés par liaisons hydrogène intermoléculaires ou, en d'autres termes, de celle des plans "a" et "b". Il serait nécessaire de connaître la structure cristalline de ces oligoglycines pour pouvoir interpréter d'une manière rigoureuse les dédoublements observés.

c) Bandes Amide III (fig. 17).

Comme nous l'avons déjà vu, l'analyse du spectre de vibration des A Gly_n EA a montré l'existence d'un couplage (A) entre les mouvements Amide III a et $\delta_s(CH_3)$ pour les premiers termes d'une part, et (B) entre les vibrations Amide III b et $\gamma\, C_\alpha\, H_2$ pour tous les termes de la série et la polyglycine II d'autre part. L'impossibilité d'un couplage entre les vibrations Amide III a et $\gamma\, C_\alpha\, H_2$ est explicable en admettant que les directions des moments de transition de ces deux derniers mouvements forment un angle proche de 90°. C'est le cas lorsqu'on envisage pour ces oligopeptides une structure de type polyglycine II (Φ = 100°, ψ = 330°). De plus, pour un tel modèle, les moments de transition des vibrations Amide III b et $\gamma\, C_\alpha\, H_2$ sont pratiquement colinéaires. C'est la raison pour laquelle ces deux mouvements sont très fortement couplés dans un enchainement de plans "b". L'évolution des couplages A et B (cf. chapitre précédent) lorsque le degré n de polycondensation augmente suggère que les angles azimutaux Φ et ψ autour des liaisons $N\text{-}C_\alpha$ et $C_\alpha\text{-}C'$ sont, dès les premiers termes, très proches des valeurs qu'ils prennent dans la chaîne hélicoïdale de la structure PG II.

II,2,3 - Etude des A Gly_n EA et PG II par diffraction des rayons X.

Nous présenterons ici les résultats obtenus au cours de l'étude préliminaire des A Gly_n EA. En effet, tous les clichés seront repris avec une référence interne et une vitesse d'exploration plus lente dans le but d'améliorer la précision des mesures qui n'est pour l'instant que de 0,01 Angström. Toutefois, cette précision est bien suffisante pour nous permettre de confirmer l'hypothèse de structure formulée à partir des données infrarouges.

Nous avons donc comparé les différents clichés de poudres obtenus par diffraction des rayons X sur échantillons polycristallins des A Gly_n EA avec celui de la polyglycine II qui est maintenant bien expliqué (39,40). Ce cliché présente en effet deux raies caractéristiques à 4,15 Å et 3,1 Å. La première, très intense est attribuée à la réflexion 1.0.0 et la seconde, beaucoup plus faible, provient principalement des plans 1.0.2 et pour une faible part des plans 0.0.3 (39). Dans les clichés des A Gly_n EA, la première raie observée provient de la réflexion 0.0.1. Cette raie nous donne la longueur de la chaîne. Or nous constatons que cette longueur augmente de façon constante (3,1 Å) lorsque l'on passe du dérivé à n chaînons au dérivé à n + 1 chaînons. Par conséquent, la longueur du résidu glycyl est égale à 3,1 Å comme dans l'hélice d'ordre 3 de PG II. Cette remarque suggère une contraction semblable de la chaîne des oligomères dès les premiers termes. Nous observons par ailleurs une raie située à 4,15 Å dans tous les clichés des A Gly_n EA pouvant provenir, comme dans PG II, d'une distance réticulaire propre de ce réseau hexagonal. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons recalculé les réflexions attendues au-dessus de 1 Å pour un tel réseau. Rappelons que pour un système hexagonal les distances réticulaires d_{hkl} obéissent à la relation

$$d_{hkl} = \frac{ac\sqrt{3}}{\sqrt{4(h^2+k^2+hk)c^2 + 3l^2a^2}}$$

dans laquelle a est pris égal à la longueur de la chaîne déterminée comme précédemment (1ère raie) et c = 4,8 Å comme dans la maille de la polyglycine II. Le calcul est en bon accord avec les clichés obtenus pour tous les A Gly_n EA. Ce résultat confirme ainsi sans ambiguité que les oligoglycines étudiées cristallisent suivant un réseau hexagonal identique à celui de la polyglycine II.

En résumé:

Dans cette partie, nous avons analysé les spectres infrarouges des A Gly_n EA en comparaison avec celui des polyglycines à l'état solide. Nous avons pu montrer que ces composés adoptent une structure de type polyclycine II dès les premiers termes. Une étude des A Gly_n EA par diffraction des rayons X nous a permis de confirmer cette hypothèse.

Nos résultats suggèrent en outre quelques remarques.

Si l'on examine les cartes conformationnelles calculées pour les résidus glycyl (6, 45, 46) nous constatons que le point correspondant à la polyglycine II ($\Phi = 100°$, $\psi = 330°$) se situe dans une zone très favorable. Il existe donc très vraisemblablement des facteurs de stabilisation intrinsèque à courte distance qui favorisent cette conformation dès que l'on enchaîne deux unités peptidiques.

Le résultat concernant l'angle Φ (environ 100° pour tous les A Gly_n EA) est aussi par lui-même particulièrement intéressant. En effet, jusqu'à présent, aucune observation convenable concernant la valeur de cet angle n'avait été obtenue expérimentalement sur de petites molécules. Il semble donc, en accord avec Koyama et Shimanouchi (24), que cette valeur soit l'une des plus probables pour un enchaînement de résidus glycyl.

CONCLUSION

Nous avons effectué l'analyse spectroscopique et conformationnelle d'une série d'oligopeptides et de certains de leurs dérivés deutériés sur l'azote à l'état isolé et à l'état condensé.

L'étude des dipeptides en solution a permis de distinguer l'influence des liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires sur le spectre de ces composés et sur leurs conformations. Nos résultats sont compatibles avec l'existence de deux formes ; l'une "étendue" ($\Phi = 0, \psi = 0$) comportant un cycle de chélation à cinq chaînons, l'autre "repliée" ($\Phi = 100°$, $\psi = 240°$) possédant un cycle à sept chainons. La proportion de ces formes varie selon le dipeptide et selon le solvant.

Nous avons proposé une méthode de dosage de ces isomères de rotation en solution dans le tétrachlorure de carbone.

Nous avons interprété le spectre infrarouge des oligoglycines et de leurs homologues N-deutériés à l'état condensé. Leur étude par diffraction des rayons X et la comparaison de leurs spectres avec ceux des polyglycines ont montré que ces oligomères présentent dès les premiers termes une structure quasi-identique à celle de la polyglycine II ($\Phi = 100°$, $\psi = 330°$, système hexagonal). Cette structure diffère par contre de celle des oligoglycines bipolaires qui adoptent, rappelons-le, une structure voisine de celle de la polyglycine I (forme β).

PARTIE EXPERIMENTALE

Les oligoglycines N-éthylées (A Gly_n E A) ainsi que les dipeptides de type I (CH_3-CONH-CHR_1-CONH-R_2) et les modèles A Sar EA, A Gly $(EA)_2$ et BAM ont été synthétisés et purifiés dans le laboratoire de chimie organique industrielle de Nancy (4). La polyglycine provient des laboratoires Miles Yeda et le N-Ethylacétamide (NEA) de la Maison Eastman.

Nous avons obtenu la polyglycine II à partir de l'échantillon commercial selon la méthode décrite par Elliott et coll (40). Les deutériations sur l'azote ont été effectuées par échanges répétés avec de l'eau lourde en excès. L'eau résiduelle est ensuite évaporée sous vide jusqu'à obtention d'un produit parfaitement sec. La polyglycine II N-deutériée a été préparée en ajoutant de l'eau lourde en excès à une solution à 1 % de polyglycine dans un mélange comprenant 40 % de D_2O et 60 % de LiBr. Les solvants ont été distillés et desséchés sur tamis moléculaire de 4 Å. La dissolution des dipeptides très peu solubles a été facilitée par l'emploi d'un dispositif d'agitation à ultra-sons.

Les longueurs des cuves varient de 1 à 30 cm. Un dispositif optique a aussi été utilisé dans certains cas pour permettre un double passage du faisceau de mesure dans la cuve d'absorption. Une cuve thermostatée de 10 cm de longueur permettant d'effectuer des variations thermiques de -30°C à + 100°C a été employée pour l'étude des solutions. Une cellule chauffante a film a servi dans le but d'obtenir certains dipeptides à l'état liquide. Nous avons utilisé un sublimateur couplé avec une cellule refroidie à la température de l'azote liquide pour observer certains produits à l'état amorphe à basse température.

Les échantillons solides ont été étudiés suivant la région spectrale en suspension dans le nujol, le fluorolube ou l'hexachlorubutadiène entre deux faces d'iodure de cœsium ou de polyéthylène.

Les spectres infrarouges des A Gly_n EA à l'état condensé et des dipeptides en solution ont été enregistrés sur les spectromètres PE 225 et Leitz G III. Entre 400 et 40 cm^{-1} nous avons utilisé un spectromètre interférométrique RIIC modèle F S 720 muni du calculateur FTC 100.

Les fréquences sont lues par interpolation par rapport aux raies de vibration-rotation de gaz dont les fréquences sont bien connues (47). La précision des lectures est de l'ordre du cm^{-1} dans les premiers cas (PE 225 et Leitz) et de $\pm$ 3 cm^{-1} dans le second (RIIC).

Les clichés de diffraction aux rayons X ont été effectués sur un diffractomètre S.E.C.A.S.I.

BIBLIOGRAPHIE

1 - J.A. SCHELLMAN et C. SCHELLMAN dans "THE PROTEINS" (H. NEURATH, éd.), vol.2, p.1, Academic Press, New York (1964).

2 - POLY-α AMINO ACIDS (G.D. FASMAN, édit.) M. DEKKER, INC. New York (1967)

3 - G.N. RAMACHANDRAN et V. SASISEKHARAN, Advances in Protein chemistry. 23, (1968)

4 - M. AVIGNON, P.V. HUONG, J. LASCOMBE, M. MARRAUD et J. NEEL, BIOPOLYMERS (à paraître).

5 - G.N. RAMACHANDRAN, C.M. VENKATACHALAM et S. KRIMM, Biophys. J., 6, 849 (1966)

6 - S.J. LEACH, G. NEMETHY et H.A. SCHERAGA, Biopolymers, 4, 369 (1966)

7 - S.I. MIZUSHIMA, T. SHIMANOUCHI, M. TSUBOI, T. SUGITA, E. KATO et E. KONDO, J. Amer. chem. Soc., 73, 1330 (1951).

8 - S.I. MIZUSHIMA, T. SHIMANOUCHI, M. TSUBOI et R. SOUDA, J. Amer. chem. Soc. 74, 270 (1952)

9 - S.I. MIZUSHIMA, T. SHIMANOUCHI, M. TSUBOI, T. SUGITA, K. KUROSAKI, N. MATAGA et R. SOUDA, J. Amer. chem. Soc. 74, 4639 (1952)

10 - S.I. MIZUSHIMA, M. TSUBOI, T. SHIMANOUCHI, T. SUGITA et T. YOSHIMOTO, J. Amer. chem. Soc. 76, 2479 (1954)

11 - S.I. MIZUSHIMA, T. SHIMANOUCHI, M. TSUBOI et T. ARAKAWA, J. Amer. chem. Soc., 79, 5357 (1957)

12 - M. TSUBOI, T. SHIMANOUCHI et S.I. MIZUSHIMA, J. Amer. Chem. Soc., 81, 1406 (1959)

13 - J.T. EDSALL, P.J. FLORY, J.C. KENDREW, A.M. LIQUORI, G. NEMETHY, G.N. RAMACHANDRAN et H.A.SCHERAGA, Biopolymers, 4, 130 (1966)

14 - R.B. COREY et L. PAULING, Proc. roy. soc. London 141B, 10, (1953)

15 - D.A. BRANT et P.J. FLORY, J. Amer. chem. Soc. 87, 2791 (1965)

16 - D.A. BRANT, W.G. MILLER et P.J. FLORY, J. Mol. Biol., 23, 47 (1967)

17 - L.P. KUHN, J. Amer. chem. Soc. 74, 2992 (1952)

18 - C.I. JOSE et P.R. PABRAI, Spectrochim. Acta, 23A , 734 (1967)

19 - H. BUC, Ann. Chim. 8, 409 (1963)

20 - M. HAURIE, Thèse 3ème cycle, Bordeaux (1962)

21 - P.V. HUONG, Rev. Inst. Fr. Pétrole, 9, 1 (1963)

22 - P.V. HUONG, J. LASCOMBE et M.L. JOSIEN, Adv. Mol. Spectr. (Pergamon Press, Bologne) 914, (1959)

23 -T. MORIWAKI, M. TSUBOI, T. SHIMANOUCHI, S.I. MIZUSHIMA, J. Amer. chem. soc., 81, 5914 (1959)

24 - Y. KOYAMA et T. SHIMANOUCHI, Biopolymers, 6, 1037 (1968)

25 - Y. GRENIE, Thèse 3ème cycle, Bordeaux (1968)

26 - T. MIYAZAWA, T. SHIMANOUCHI et S.I. MIZUSHIMA, J. chem. phys., 24, 408 (1956)

27 - T. MIYAZAWA, T. SHIMANOUCHI et S.I. MIZUSHIMA, J. chem. Phys., 29, 611 (1958)

28 - E.M. BRADBURY et A. ELLIOTT, Spectrochim. Acta, 19, 955 (1963)

29 - M. BEER, H.B. KESSLER et G.B.B.M. SUTHERLAND, J. chem. phys. 29, 1097 (1958)

30 - H.PIVCOVA, B. SCHNEIDER, J. STOKR, coll. czechoslov. chem. commun. 30, 2215 (1965)

31 - B. SCHNEIDER, A. HORENI, H. PIVCOVA, et J. HONZL, coll. czechoslov. chem. commun., 30, 2196 (1965)

32 - J. JAKES et B. SCHNEIDER, coll. czechoslov. chem. commun., 33, 643 (1968)

33 - S. SUZUKI, Y. IWASHITA, T. SHIMANOUCHI et M. TSUBOI, Biopolymers., 4, 337 (1966)

34 - S. KRIMM et K. KUROIWA, Biopolymers., 6, 1037 (1968)

35 - K. ITOH et T. SHIMANOUCHI, Biopolymers, 5, 921 (1967)

36 - T. MIYAZAWA dans "POLY- α AMINO ACIDS" (G.D. FASMAN éd.) M. DEKKER, INC. New York (1967) p. 69-103.

37 - C.H. BAMFORD, L. BROWN, A. ELLIOTT, W.E. HANDBY et I.E. TROTTER, Nature, 171, 1199 (1953)

38 - L. PAULING et R.B. COREY, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 37, 729 (1951)

39 - F.H.C. CRICK et A. RICH., Nature, 176, 780 (1955)

40 - A. ELLIOTT et B.R. MALCOM, Trans. Faraday. soc., 52, 528 (1956)

41 - S. KRIMM, Nature 212, 1482 (1966)

42 - R.M. BADGER et A.D.E. PULLIN, J. chem. phys., 22, 1142 (1954)

43 -T. MIYAZAWA et E.R. BLOUT, J. Amer. chem. soc. 83, 712 (1961)

44 - S. KRIMM, J. Mol. Biol., 4, 528 (1962)

45 - G.N. RAMANCHANDRAN, C. RAMAKRISHNAN, et V. SASISEKHARAN, J. Mol. Biol., 7, 95 (1963)

46 - P. DE SANTIS, E. GIGLIO, A.M. LIQUORI et A. RIPAMONTI, Nature, 206, 456 (1965)

47 - Tables of Wavenumbers for the Calibration of Infrared Spectrometers., Ed. I.U.P.A.C. (Butterworth, London) (1961).

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

CALCULS CONFORMATIONNELS DES MACROMOLECULES